

อภิธานการ



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรรพรมมิ และสารสำคัญ

ต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดในหนู

Pharmacological actions of *Bacopa monniera* and its active compounds
on rat cardiovascular system

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน... 5 JUN 2011...

เลขทะเบียน... 15667805

เลขเรียกหนังสือ... RM

500

11855

2553

ผศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์ และคณะ

กรกฎาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรรณมิ และสารสำคัญ

ต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดในหนู

Pharmacological actions of *Bacopa monniera* and its active compounds
on rat cardiovascular system

โดย

ผศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์¹รศ.ดร. กรกนก อิงคินันท์²Dr. C. Norman Scholfield³นาย อนุสรณ์ คำแก้ว¹¹คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร³บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ปัญหา : โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือดเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญอันดับต้นๆของประเทศไทย ยาสมุนไพรอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรค มีรายงานว่าสมุนไพรพรมมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในปอด และหลอดเลือด aorta ของกระต่าย แต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ชัดเจน และผลของพรมมีที่มีต่อหลอดเลือดทางหนู ซึ่งเป็นหลอดเลือดขนาดเล็กมีบทบาทในการควบคุมความดันเลือดยังไม่มีการศึกษา รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

วัตถุประสงค์และวิธีการดำเนินการ : เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพรมมีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดในสัตว์ทดลอง โดยดูผลโดยตรงของการฉีด (intravenous injection) สมุนไพรพรมมีต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจในหนู (Wistar rat) ที่สลบ และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพรมมีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดในหลอดทดลอง โดยดูผลโดยตรงของสารสกัดสมุนไพรพรมมีต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงที่แยกมาจากหางหนู รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่แคลเซียมเข้าเซลล์ และการเคลื่อนที่ภายในเซลล์ จากนั้นศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพรมมี และสารสำคัญของสมุนไพรพรมมี ที่มีต่อประตูแคลเซียมอออน (calcium channel) ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกมาจากหลอดเลือดแดงจากหางหนู

ผลของการศึกษาค้นคว้า : เมื่อนำสารสกัดพรมมีทางหลอดเลือดดำทำให้ความดันเลือด systolic และ diastolic ลดลง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อหยดสารสกัดพรมมี ($> 1 \text{ mg/ml}$) ลงบนหลอดเลือดแดงที่แขวนอยู่ในสภาวะ resting tone พบว่าทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด อย่างไรก็ตามสารสกัดพรมมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวชัดเจนกว่าเมื่อทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อนด้วย phenylephrine (PE) ($1 \mu\text{M}$) โดยการคลายตัวของหลอดเลือดแดงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดพรมมี (concentration-dependent manner) และในการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าเซลล์ พบว่าสารสกัดพรมมีและ nifedipine (Ca^{2+} channel blocker) ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย $0.01\text{-}10 \text{ mM CaCl}_2$ และสารสกัดพรมมียังยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมภายในเซลล์โดยยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดโดย PE และ caffeine สำหรับผลการทดลองในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ พบว่าสารสกัดพรมมี ($10, 100 \mu\text{g/ml}$), saponins ($10 \mu\text{g/ml}$) และ nifedipine ($1 \mu\text{M}$) ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ba^{2+} current ผ่าน L-type Ca^{2+} channel

การค้นพบ : สารสกัดพรมมีผลทำให้ความดันเลือดลดลง เนื่องมาจากทำให้หลอดเลือดขยายตัว โดยการออกฤทธิ์ผ่าน smooth muscle cells กลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ และยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมภายในเซลล์ โดยน่าจะยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่าน L-type Ca^{2+} channel

คำสำคัญ : *Bacopa monniera*; saponins; blood pressure; heart rate; vascular tone; L-type Ca^{2+} channel

Abstract

Background: Cardiovascular disease is a major health problem in Thailand. Some Thai medicinal plants could provide potentially alternative treatment or reduce cardiovascular disease risk. *Bacopa monniera* or 'Brahmi' is a well-known cognitive enhancer in Indian and Chinese traditional medicine systems. *B. monniera* extract (BME) was reported to show the relaxant action on rabbit pulmonary arteries and aorta. However, the mechanisms of this action are unclear and the effect on rat tail artery has not yet been investigated. Furthermore, the roles of its constituent saponins on the cardiovascular system are unknown.

Objectives and Methods: To examine the effects of BME on (i) blood pressure (BP) and heart rate (HR) using anaesthetized rats (ii) vascular tone of the isolated rat tail artery and the role of extracellular and intracellular Ca^{2+} movements (iii) Ca^{2+} influx via Ca^{2+} channels in single smooth muscle cells isolated from tail artery and the pure compounds of BME.

Results: BME caused a dose-dependent decrease in systolic and diastolic blood pressure without affecting heart rate. In isolated vessels, BME (0.1-5.0 mg/ml) showed vasocontractile effects in resting tone, but when endothelium-denuded and precontracted by phenylephrine (1 μM), BME (0.1-5.0 mg/ml) induced a concentration-dependent relaxation. In Ca^{2+} -free solution, adding Ca^{2+} produced concentration dependent contractions, which were inhibited by BME and by nifedipine. In Ca^{2+} free solution, BME also inhibited the contractile effects of phenylephrine and caffeine induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum (SR). In isolated vascular smooth muscle cells, BME (10, 100 $\mu\text{g/ml}$) and partially purified saponins (10 $\mu\text{g/ml}$) blocked inward calcium currents through Ca^{2+} channels, similar to the L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine (1 μM) whereas pure bacopaside I had no effect.

Conclusion: The results indicated that BME decreased blood pressure without affecting heart rate, suggesting a vasodilatory effect, an idea confirmed by the relaxation of the isolated rings. This action appears to be mediated by preventing Ca^{2+} entry into the smooth muscle cells because (a) BME reduced the effectiveness of extracellular Ca^{2+} and (b) it blocked inward current in single cells, and it also blocked Ca^{2+} release from SR. Therefore, BME induced vasodilation via the mechanisms of extracellular and intracellular Ca^{2+} movements. The Ca^{2+} entry route may be through the L-type Ca^{2+} channel because the effects were replicated by nifedipine. This idea is supported by the inhibition of voltage activated inward current through L-type Ca^{2+} channels. Therefore, BME produced hypotension by vasorelaxation through blocking L-type Ca^{2+} channels. Further study is needed to identify the individual saponins responsible for this effect.

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่ของโลกตายจากโรคทางระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด โดยพบว่าในปี ค.ศ. 2005 มีประมาณ 17.5 ล้านคน เสียชีวิตจากโรคทางระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด ซึ่งคิดเป็นประมาณ 30% ของการตายทั้งหมดของประชากรโลก 53.4 ล้านคน (WHO) และในประเทศไทยโรคทางระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดก็เป็นสาเหตุหลักของการตายของประชากรไทยในปี ค.ศ. 1997 – 2000 (Bureau of Non Communicable Disease, 2006) ภาวะความดันเลือดสูง เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของโรคดังกล่าว ดังนั้นการควบคุมและลดความดันเลือดจึงสามารถลดอัตราการตายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ezzati et. al., 2002) ปัจจุบันนี้การใช้สมุนไพรเป็นที่น่าสนใจและเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำและมีประสิทธิภาพในการรักษาสูง ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดจึงมีความสำคัญ ที่จะนำไปสู่การผลิตยาเพื่อป้องกันและรักษาภาวะความดันเลือดสูง

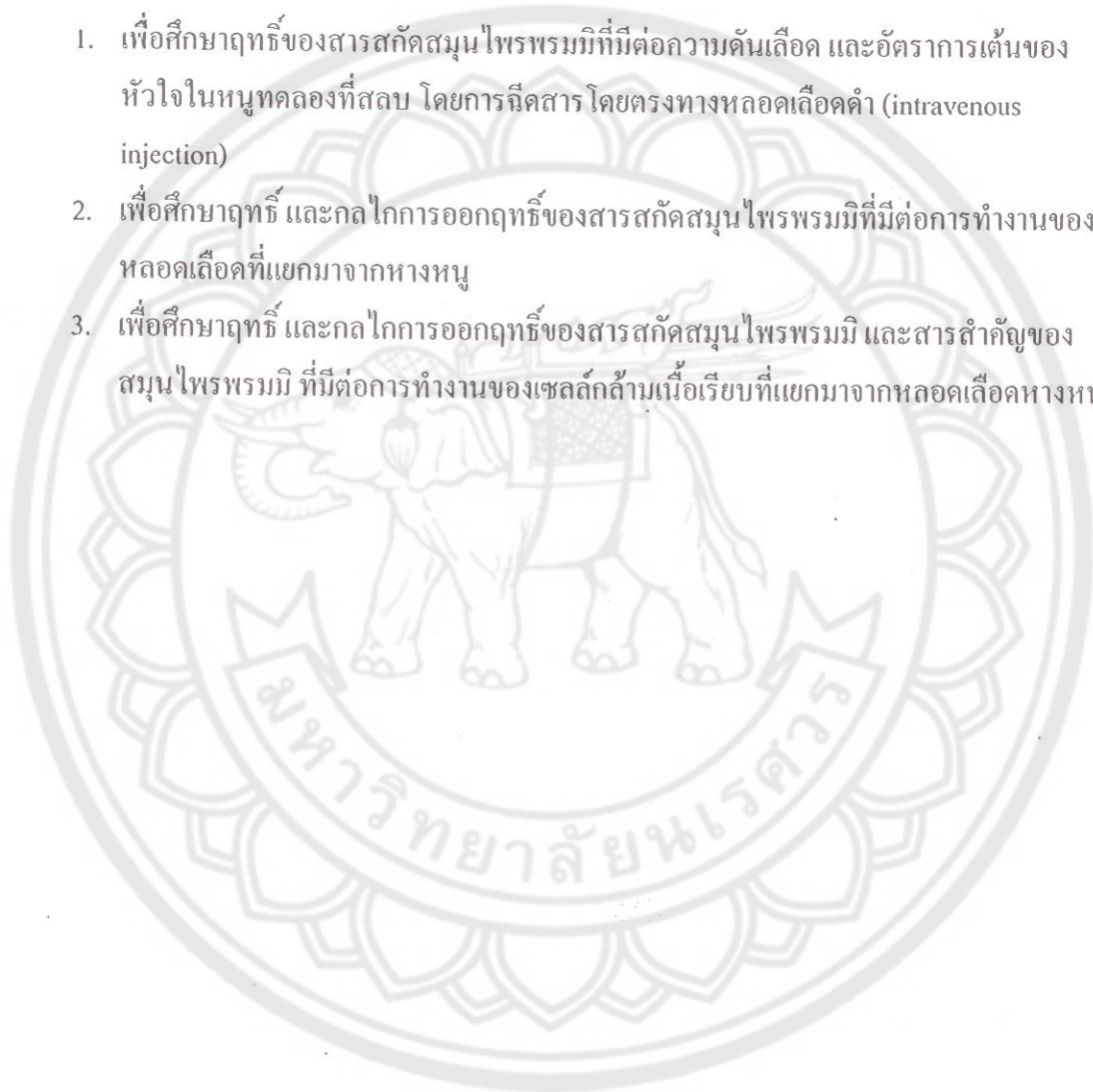
พรมมิ (*Bacopa monniera*) คือ พืชสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ยาวนาน พบได้ทั่วไปในที่ชื้นแฉะและแถบอินโด-ปากีสถาน (Nadkarni, 1976) และประเทศไทย ในการแพทย์อายุรเวทของอินเดียระบุว่าพรมมิมีสรรพคุณ บำรุงความจำ บำรุงสมอง (Singh and Dhawan, 1997) การศึกษาฤทธิ์ของพรมมิ บ่งชี้ว่าสารสกัดพรมมิและสารสำคัญของพรมมิเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ (Singh and Dhawan, 1982; Das et. al., 2002, Hota et. al., 2009) มีฤทธิ์ด้านการซึมเศร้า (Sairam et. al., 2002) และต้านการอักเสบ (Channa et. al., 2006) เป็นต้น การศึกษาทางคลินิกพบว่าการใช้พรมมินานติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน ช่วยเพิ่มความสามารถในการจำในอาสาสมัครสุขภาพดี (Stough, 2001) สารที่มีฤทธิ์ในพรมมิ คือสารกลุ่ม saponins ชื่อ bacoside A, B (Sairam et. al., 2002)

ระบบไหลเวียนเลือดเป็นระบบที่ทำหน้าที่นำเลือดไปเลี้ยงยังส่วนต่างๆของร่างกายรวมทั้งสมอง มีรายงานการศึกษาในหนูพบว่าสารสกัดพรมมียังมีฤทธิ์ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด aorta and pulmonary arteries ของกระต่าย (Dar & Channa, 1997, 1999; Channa et al, 2003) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ โดยยับยั้งการไหลของ Ca^{2+} เข้าเซลล์ (Dar & Channa, 1999) และอาจเกี่ยวข้องกับ prostacyclin pathway (Dar & Channa, 1997) ตลอดจนยังพบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดไม่ขึ้นกับ endothelium และไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น muscarinic receptors (Dar & Channa, 1997) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญ ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดยังไม่ชัดเจน รวมทั้งยังไม่มีรายงานผลของพรมมิที่มีต่อหลอดเลือดของเล็กลงไป เช่น rat tail artery ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมความดันเลือด นอกจากนี้ข้อมูลเชิงลึกด้านกลไกการ

ออกฤทธิ์ของทั้งสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญ เช่น Bacopaside I ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โครงการวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญ ทั้งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวัดความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจในหนู ฤทธิ์ต่อการหดและคลายตัวของหลอดเลือด rat tail artery และการเคลื่อนที่ของแคลเซียมไอออนผ่าน voltage gated (L-type) Ca^{2+} channels ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกมาจาก rat tail artery

2. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรพรมมิที่มีต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่สลบ โดยการฉีดสาร โดยตรงทางหลอดเลือดดำ (intravenous injection)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรพรมมิที่มีต่อการทำงานของหลอดเลือดที่แยกมาจากหางหนู
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรพรมมิ และสารสำคัญของสมุนไพรรพรมมิ ที่มีต่อการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกมาจากหลอดเลือดหางหนู



บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดพรมมิ

ตัวอย่างพรมมิที่เป็นส่วนเหนือดินถูกเก็บมาจากจังหวัดเพชรบุรี โดยบริษัท Health and Herbs ซึ่งได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย รศ.ดร.วงศ์สถิต นั้วกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ Voucher specimen (Phrompittayarat001) เก็บไว้ที่ PBM Herbarium มหาวิทยาลัยมหิดล การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและสารสกัดพรมมิโดย รศ.ดร.กรกนก อิงคณินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

การเตรียมการสกัดพรมมิ โดยนำพรมมิที่เป็นส่วนเหนือดินอบด้วยอุณหภูมิ 50 °C นาน 12 ชั่วโมง นำไปบดให้ได้ผงหยาบ จากนั้นสกัดด้วย 95% ethanol ในอัตราส่วน 1 g: 7 ml โดยเครื่อง percolator ทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง ต่อมานำไประเหยแห้ง โดยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ สารสกัดพรมมิที่ได้มี % yield เท่ากับ 10% มีสารสำคัญ คือ 6.25% (w/w) total saponins ซึ่งประกอบด้วย 0.87% bacoside A₁, 1.03% bacoside I, 1.82% bacoside II, 0.8% bacoside X และ 1.73% bacosaponin C (Phrompittayarat et al., 2007a, b) สารสกัดถูกเก็บไว้ในขวดที่ปิดอุณหภูมิ 5 °C สารสำคัญที่ใช้ได้แก่ bacoside I ของบริษัท Chromadex (CA, USA)

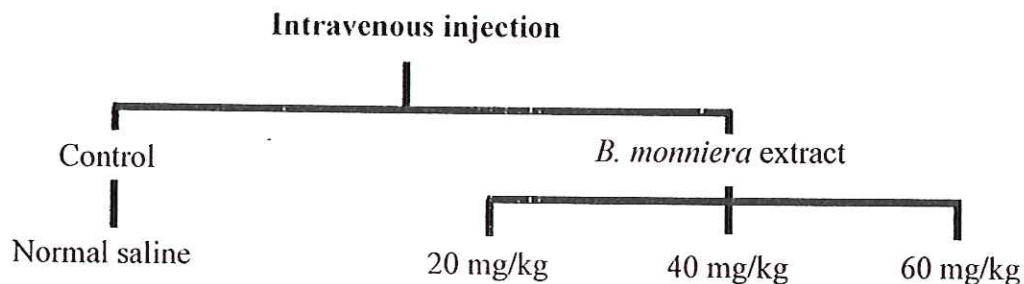
สัตว์ทดลอง

หนู (wistar rat) เพศผู้ 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม หนูทดลองถูกนำมาเลี้ยง 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยควบคุมแสงสว่าง 12:12 hr light:dark cycle และอุณหภูมิ 25 ± 5 °C และได้รับอาหารเม็ด (สูตร G082, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) และน้ำอย่างบริบูรณ์ ตามหลักการของ the guide for the care and use of laboratory animals (Institute of Laboratory Animal Research, 1996) สัตว์ทดลองถูกสลบด้วย pentobarbital sodium (intraperitoneal injection; i.p.) ขนาด 50 mg/kg BW ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 5-6 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง

1. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิที่มีต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจ

- การออกแบบการทดลอง *in vivo* ศึกษาผลต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจ

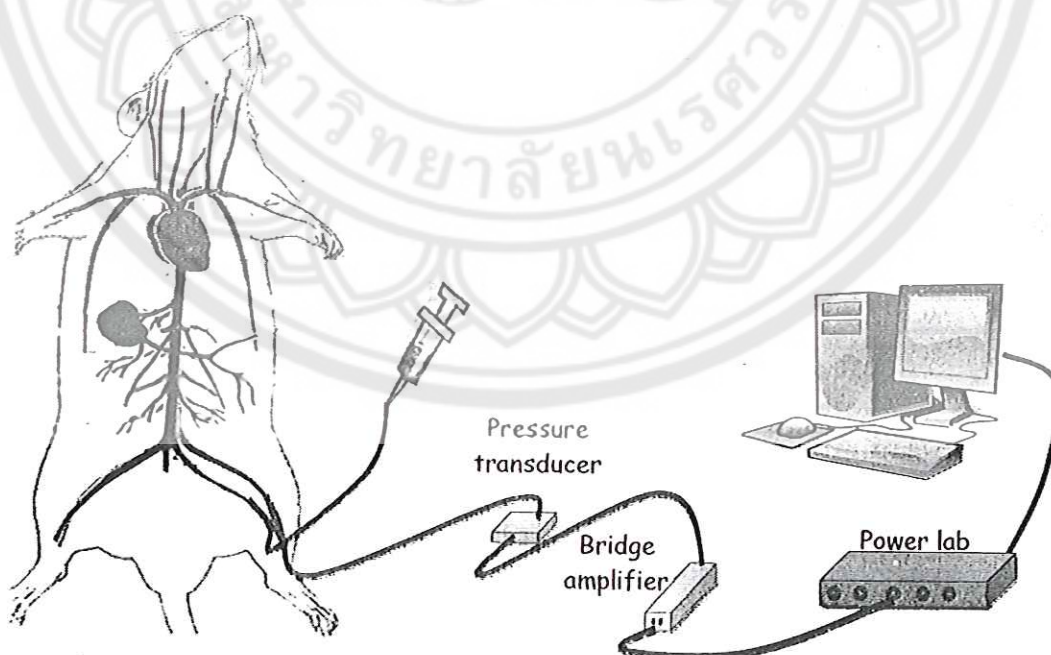
สัตว์ทดลองถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้สารสกัดพรมมิ กลุ่มที่ให้สารสกัดพรมมิแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามขนาดของสารสกัดที่ให้ (20, 40, 60 mg/kg Body Weight) ดังแผนภาพ



รูปที่ 1 การออกแบบการทดลอง *in vivo* ผลต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจ

- การศึกษาผลต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจ

สัตว์ทดลองถูกสลบด้วย pentobarbital sodium (intraperitoneal injection; i.p.) ขนาด 50 mg/kg BW หลังจากสัตว์ทดลองสลบดีแล้วแล้วตรึงขาไว้ที่ operating pad ด้วยเทปกาว แล้วทำการผ่าตัดบริเวณขาหนีบ (femoral) เพื่อสอดสาย polyethylene tube (PE 50 023"ID x .038"OD) ไปยัง femoral vein สำหรับการฉีด normal saline (control) หรือสารสกัดพรมมิ ขนาด 20, 40, 60 mg/kg ปริมาตร 0.3 ml ด้วยอัตราเร็ว 1.0 ml/min และสอดสาย polyethylene tube อีกอันไปยัง femoral artery สำหรับวัดความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ ซึ่งสายทั้งสองมี heparinised saline อยู่ สำหรับ arterial catheter เชื่อมต่อกับ pressure transducer และ PowerLab 4SP (ADInstruments) ดังแสดงตามภาพของอุปกรณ์ในรูปที่ 2 ความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจจะแสดงบนคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Chart v.5.4 (ADInstruments) หลังจากนั้นสัตว์ทดลองถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วยการตัดขั้วหัวใจ ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วจะถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ -20 °C จนกว่าจะนำไปฝัง

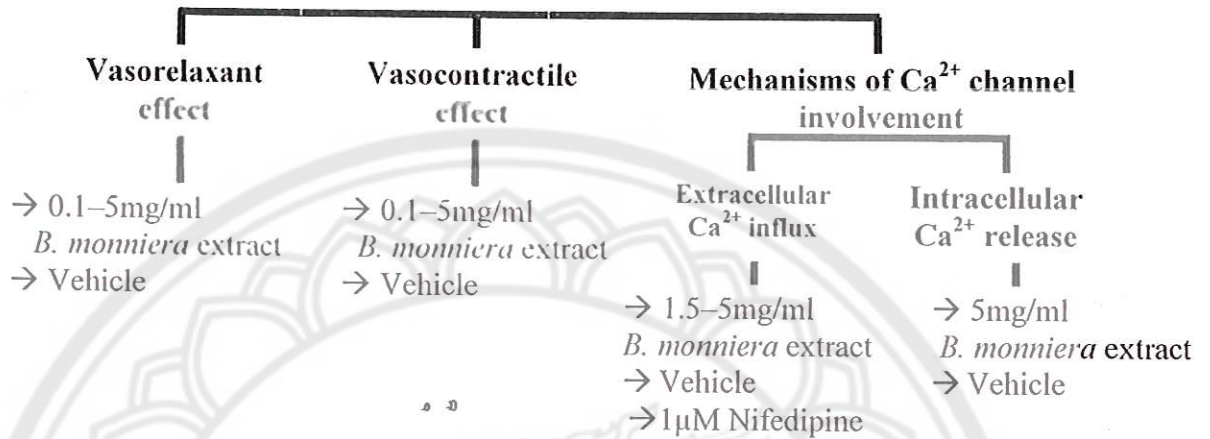


รูปที่ 2 เครื่องมือ cannulation สำหรับศึกษาความดันเลือดและอัตราการเต้นของหัวใจ

2. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิที่มีต่อหลอดเลือด

- การออกแบบการทดลองศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิที่มีต่อหลอดเลือด

สัตว์ทดลองถูกแยกหลอดเลือดหางหนู เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรมมิที่มีต่อแรงดึงตัวหลอดเลือด ประกอบด้วย การทดลอง ดังแผนภาพ



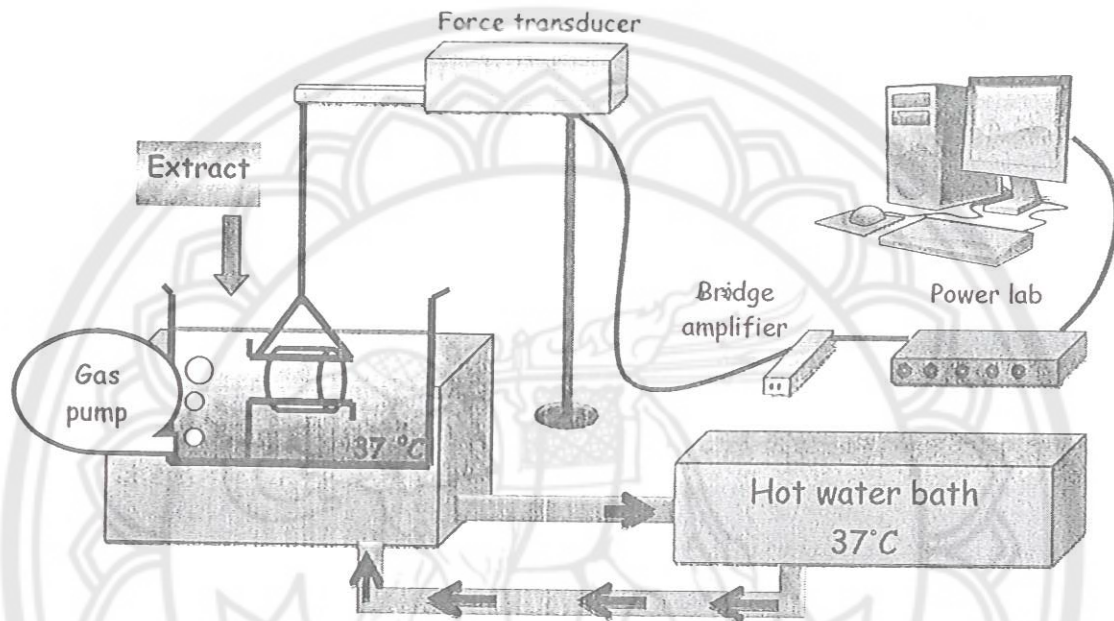
รูปที่ 3 การออกแบบการทดลอง *in vitro* ศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อแรงดึงตัวของหลอดเลือด

- การเตรียมหลอดเลือด

หลังจากสัตว์ทดลองสลบแล้ว ถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วยการตัดขั้วหัวใจ แล้วแยกหลอดเลือดแดงจากหางหนูออกมา และใส่ไว้ใน Krebs Solution ทำความสะอาด connective tissue ที่ติดหลอดเลือด หลอดเลือดจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ยาวประมาณ 0.5 cm แล้วนำไปแขวนใน chambers ของ organ bath ที่มีสารละลาย Krebs Solution ที่มีส่วนประกอบ คือ 122 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine N'-(2-ethanesulfonic acid)] HEPES, 0.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 11 mM glucose และ 1.8 mM CaCl_2 และปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH ตลอดควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 °C และมีอากาศที่มี O_2 ไหลผ่าน หลอดเลือดที่แยกได้แล้วจะถูกแขวนด้วยแรงดึงที่ระดับ optimal tension (1 กรัม) และทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อย 45 นาทีก่อนทำการทดลอง โดยทำการเปลี่ยน Krebs Solution ทุกๆ 15 นาที หลังจากนั้นทำให้หลอดเลือดหดตัวด้วยการหยด 1 μM phenylephrine (PE) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น α_1 -receptor agonist เมื่อการหดตัวถึงที่แล้ว หยด 10 μM acetylcholine (ACh) เพื่อทดสอบ endothelium โดย intact endothelium พิจารณาจากเมื่อหยด ACh แล้วหลอดเลือดคลายตัวมากกว่า 70% จากนั้นล้างด้วย Krebs Solution เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ซึ่งต่อจากนี้ทำการทดลองศึกษาการหดตัวหรือคลายตัวของหลอดเลือด

การตอบสนองของหลอดเลือดจะถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของแรงดึงหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหยดสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นต่างๆกันลงใน organ bath ที่มีหลอด

เลือดแขวนอยู่ แรงที่เกิดขึ้นจะถูกแปลงสัญญาณ โดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (force transducer) และกราฟการตอบสนองที่ได้จะถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney, Australia) ดังแสดงตามภาพของอุปกรณ์ในรูปที่ 4 จำนวนตัวอย่างของสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาต่อกลุ่ม คือ 5-6 ตัว ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วจะถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ -20°C จนกว่าจะนำไปฝัง



รูปที่ 4 เครื่องมือ organ bath สำหรับศึกษาการทำงานของหลอดเลือด

2.1 การศึกษาการหดตัวของหลอดเลือด

หยดสารสกัดพรมิตามความเข้มข้นต่างๆใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแขวนอยู่ในสถานะ resting tone จากนั้นล้างด้วย Krebs solution เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วใส่สารละลายโปแตสเซียมความเข้มข้นสูง (80 mM K^+) บันทึกค่าความแรงการหดตัวที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเปรียบเทียบกับค่าการหดตัวของหลอดเลือดที่มีต่อสารละลาย 80 mM K^+ เมื่อสิ้นสุดการทดลองทดลองจนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารที่เป็นตัวทำละลายสารสกัด

2.2 การศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือด

ทำให้หลอดเลือดหดตัวด้วยสาร $1\text{ }\mu\text{M}$ phenylephrine (PE) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น α_1 -receptor agonist เมื่อหลอดเลือดหดตัวในระดับที่คงที่แล้ว จึงหยดสารสกัดตามความเข้มข้นต่างๆ (0.1-5.0

mg/ml) ใน organ bath บันทึกค่าแรงหดตัวที่เปลี่ยนแปลงไปเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารที่เป็นตัวทำละลายสารสกัดพรมมิ

2.3 ศึกษาผลไปการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิ

2.3.1 ศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกสู่ภายในเซลล์

Preincubate หลอดเลือดที่ปราศจาก endothelium ด้วยสารละลาย Ca^{2+} -free Krebs solution (0Ca^{2+} Krebs) เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นจึงใส่ Ca^{2+} -free 80 mM K^+ solution เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดอยู่ในภาวะ depolarization และกระตุ้นให้เกิดการเปิดของประตูแคลเซียม จากนั้นจึงหยุดสารละลาย $0.01\text{-}10\text{ mM CaCl}_2$ โดยเพิ่มความเข้มข้นตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นห่างกัน 5 นาที เมื่อหลอดเลือดหดตัวจนถึงจุดสูงสุดจึงล้างด้วย Krebs solution และ re-incubate หลอดเลือดด้วย Ca^{2+} -free Krebs solution เป็นเวลานาน 30 นาที และใส่ Ca^{2+} -free 80 mM K^+ solution ซ้ำอีกครั้งเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบและหลอดเลือดอยู่ในภาวะ depolarization และกระตุ้นให้เกิดการเปิดของประตูแคลเซียม จากนั้นจึง preincubate หลอดเลือดด้วยสารสกัดพรมมิ หรือ $1\text{ }\mu\text{M}$ nifedipine (antagonist of L-type Ca channels, $\text{Ca}_v1.2$) เป็นเวลานาน 10 นาที และตามด้วยการหยุดสารละลาย $0.01\text{-}10\text{ mM CaCl}_2$ ตามลำดับ

2.3.2 ศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum เข้าสู่ภายในเซลล์

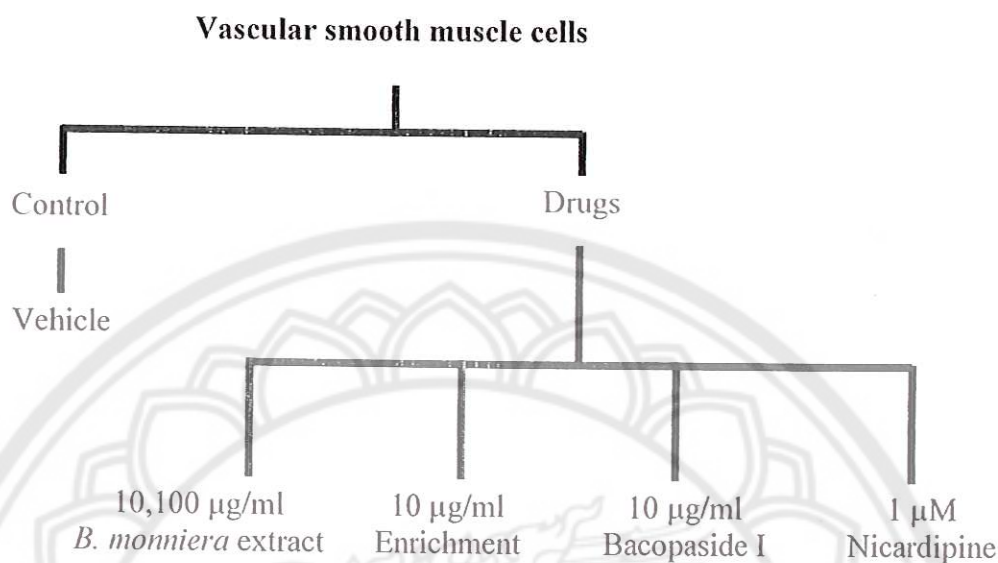
ทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อนด้วย $10\text{ }\mu\text{M}$ PE จากนั้นจึงล้างด้วย Krebs solution เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงทำขั้นตอนที่ 1 โดยให้หลอดเลือดหดตัวด้วย 80 mM K^+ Krebs solution แล้วใส่สารละลาย Ca^{2+} -free Krebs solution (0Ca^{2+} krebs + 1 mM EGTA) เป็นเวลา 10 นาที ต่อมาทำให้หลอดเลือดหดตัวซ้ำอีกครั้งด้วย $10\text{ }\mu\text{M}$ PE หรือ 20 mM caffeine จากนั้นจึงล้างด้วย Krebs solution เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที และทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 อีกครั้ง ต่อมาในขั้นตอนที่ 2 ทำให้หลอดเลือดหดตัวซ้ำด้วย 80 mM K^+ Krebs solution แล้วใส่สารละลาย Ca^{2+} -free Krebs solution (0Ca^{2+} Krebs + 1 mM EGTA) ที่มีสารสกัดพรมมิ (5 mg/ml) อยู่ เป็นเวลา 10 นาที และทำให้หลอดเลือดหดตัวซ้ำอีกครั้งด้วย $10\text{ }\mu\text{M}$ PE หรือ 20 mM caffeine หลังจากนั้นล้างด้วย Krebs solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและทำซ้ำขั้นตอนที่ 1 อีกครั้งเพื่อดูการ recovery ของหลอดเลือดหลังจากให้สารสกัดพรมมิ เปรียบเทียบความแรงในการหดตัวของหลอดเลือด

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิและสารสำคัญต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากหลอดเลือด

- การออกแบบการทดลองศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากหลอดเลือด

การทดลองนี้เพื่อทดสอบว่า L-type Ca channel เป็นเป้าหมายสำหรับการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อให้สารสกัดพรมมิ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบถูกแยกออกมาจากหลอดเลือดหางหนู ศึกษาการ

การเปลี่ยนแปลงของ Ba^{2+} current ผ่าน Ca channel เมื่อให้ 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ *B. monniera* extract, 10 $\mu\text{g/ml}$ enrichment saponins, 10 $\mu\text{g/ml}$ bacopaside I และ 1 μM nicardipine (an antagonist of L-type Ca channels) ดังแผนภาพ



รูปที่ 5 การออกแบบการทดลอง *in vitro* ศึกษาผลของ inward Ca^{2+} currents

- การแยกเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากหลอดเลือดหางหนู

นำหลอดเลือดที่แยกได้จากหางหนูมาตัดตามแนวยาว และแนวขวางตามลำดับให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปใส่สารละลายแยกเซลล์ (Dissociation Medium) ที่มีส่วนประกอบ คือ 110 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 0.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, 0.03 mM phenol red, 10 mM taurine, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), และ 2 mM MgCl_2 และปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH นำหลอดเลือดที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วไป incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C กับสารละลาย DM ที่มีส่วนผสมของ papain (0.8 mg/ml) bovine serum albumin (0.04%) และ 1,4-dithiothreitol (0.4 mM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ต่อเป็นเวลา 30 นาทีจึงเติม collagenase (0.8 mg/ml) และ incubate ต่ออีก 10 นาที แล้วนำหลอดเลือดมาเปลี่ยนใส่ enzyme-free DM และใช้ pasture pipette ดูดชิ้นหลอดเลือดขึ้นลงช้าๆจนกว่าจะได้เซลล์หลอดเลือดที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวยหัวเรียบ

- การศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญที่มีต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบโดยใช้เทคนิค Patch Clamp

หยดเซลล์หลอดเลือดที่แยกได้แล้วลงใน bath รอให้เซลล์เกาะติดแน่นกับแผ่นสไลด์ แล้ว perfuse ด้วย Hanks solution ที่ประกอบด้วย 5 mM glucose, 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 1.3 mM MgCl_2 , 140 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , (pH = 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในการทดลองนี้จะใช้เทคนิค

whole cell perforated patch clamp ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องเติม amphotericin B ใน pipette solution ที่ประกอบด้วย 125 mM CsCl, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ (pH = 7.4) ถ้า pipette resistance เท่ากับ 4-8 MΩ L-type Ca²⁺ currents ถูกกระตุ้นโดยการ holding membrane potential หรือ clamp ความต่างศักย์ไว้ที่ ไว้ที่ -80 mV และ step ไปสู่ +10 mV ด้วย 300 ms voltage commands ทุกๆ 10 วินาที ในการทดลองนี้ inward currents ถูกเพิ่มขึ้นโดยการใส่ barium (10 mM BaCl₂) ซึ่งเพิ่ม permeant ของ inward currents ผ่าน Ca-channel เมื่อ inward currents (control) ลงที่เปลี่ยนสารละลายที่ผ่าน cell เป็น Ba ที่มี 10 µg/ml *B. monniera* extract ผสม และ recovery โดย Ba Hanks' solution อีกครั้ง วิธีเดียวกันใช้ทดสอบผลของ Ba ที่มี 100 µg/ml *B. monniera* extract, 10 µg/ml high saponin, 10 µg/ml Bacopaside I และ 1 µM nifedipine ผสม ทำการวัด calcium current ในภาวะปกติเปรียบเทียบกับภาวะที่ให้สารสกัดพรมมิ และ สารสำคัญของพรมมิ

วิเคราะห์ผลการทดลอง

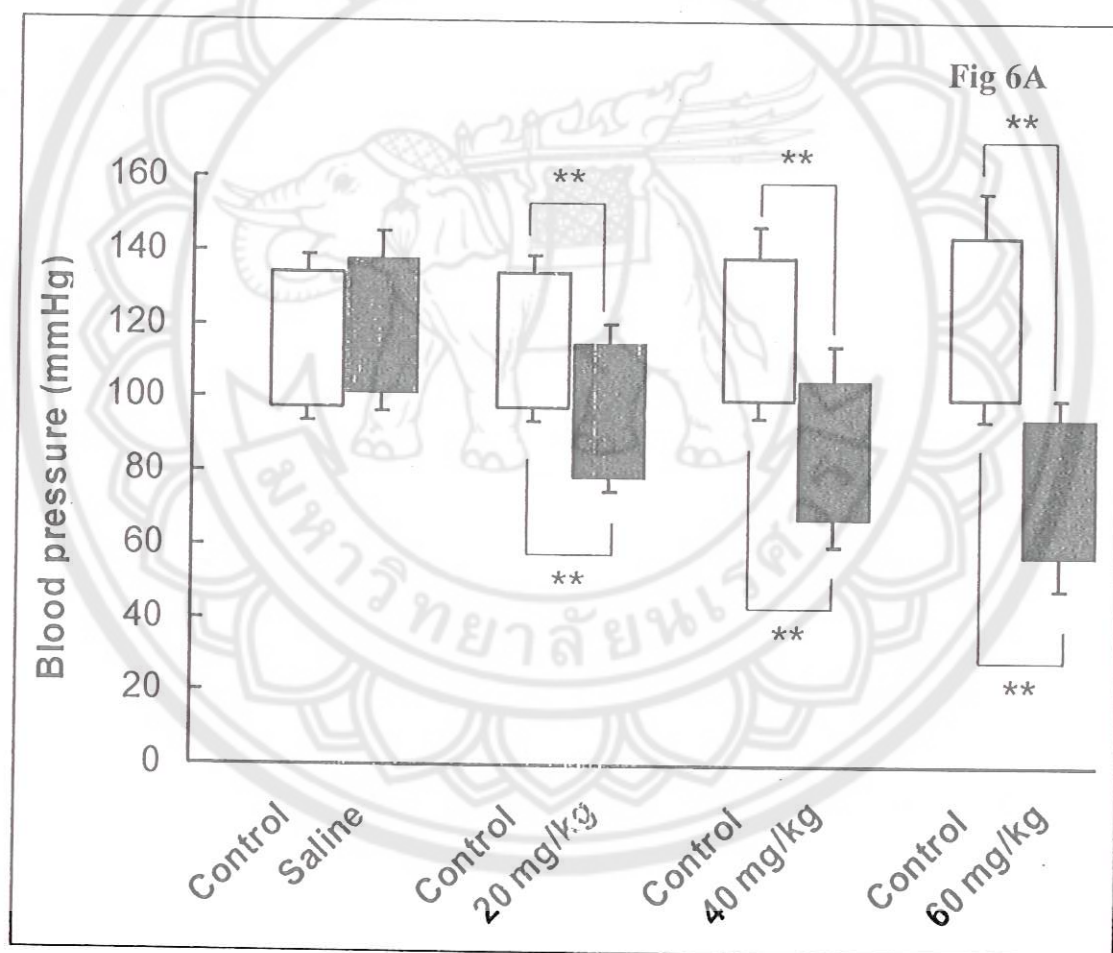
ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณ ซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (mean) และความน่าเชื่อถือค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (SEM) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหรือสารสำคัญจะทำโดยวิธี student t-test และ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และค่า p value < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

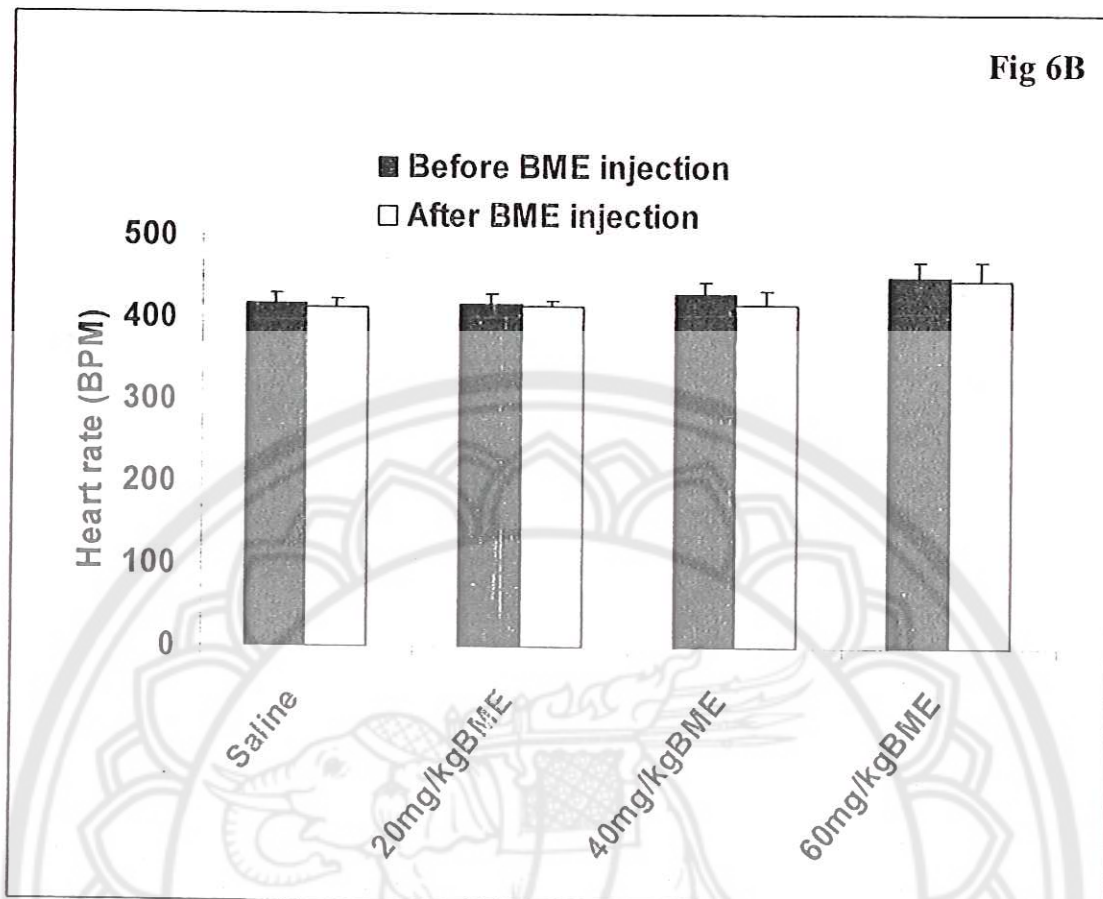
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดพรมมิต่อความดันเลือด และ อัตราการเต้นของหัวใจ

เมื่อฉีดสารสกัดพรมมิที่ขนาด 20, 40 และ 60 mg/kg ทางหลอดเลือดดำ พบว่าทำให้ความดันเลือด systolic และ diastolic ลดลง ซึ่งการลดลงของความดันมากขึ้นตามขนาดที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดพรมมิ (dose-dependent manner) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความดันเลือด เมื่อฉีด normal saline ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (รูป 6A) และสารสกัดพรมมิไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ (รูป 6B)

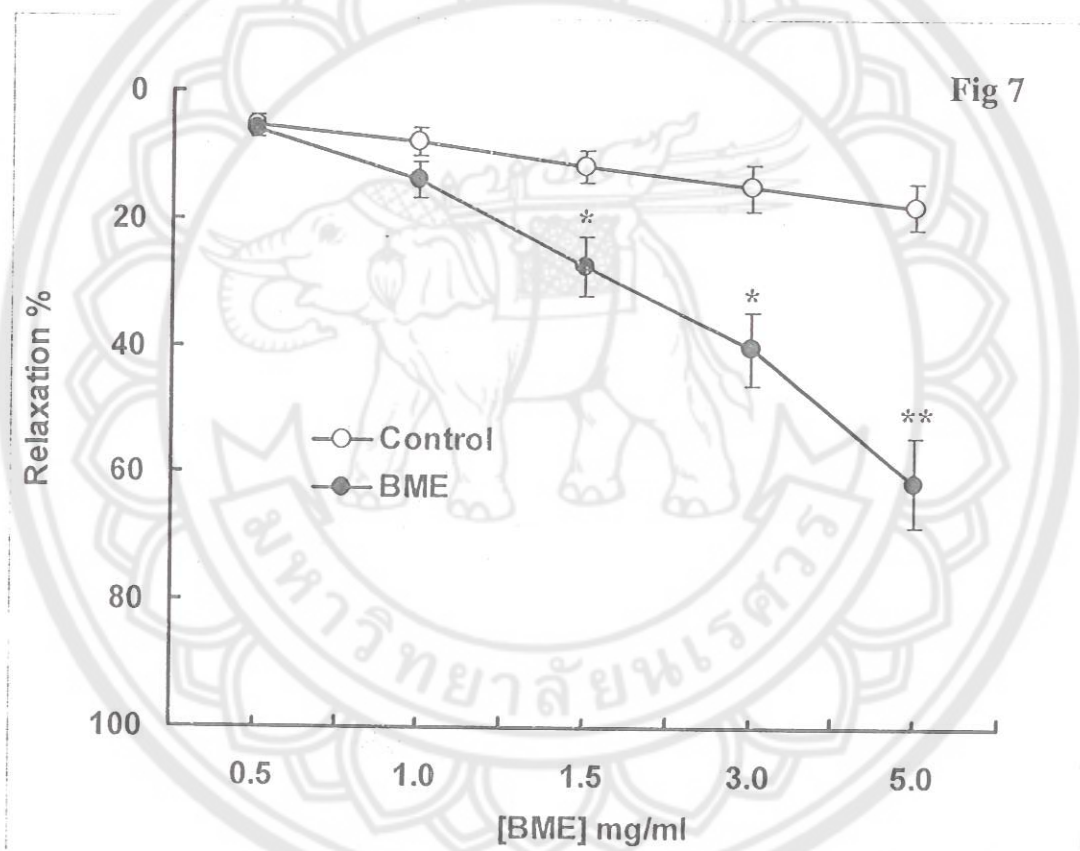




รูป 6 ผลของสารสกัดพรมมิ ขนาด 20, 40 และ 60 mg/kg BW เมื่อให้ทางหลอดเลือดดำ ที่มีผลต่อความดัน Systolic blood pressure (P_s) และ Diastolic blood pressure (P_d) (6A) และ ผลต่อ Heart rate (HR) (6B) ค่าต่าง ๆ คือ Mean \pm SEM (n = 4-6), ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่เป็น baseline ก่อนฉีดสารสกัดพรมมิ และกลุ่มหลังฉีดสารสกัดพรมมิ

2. ผลของสารสกัดพรมมิ ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

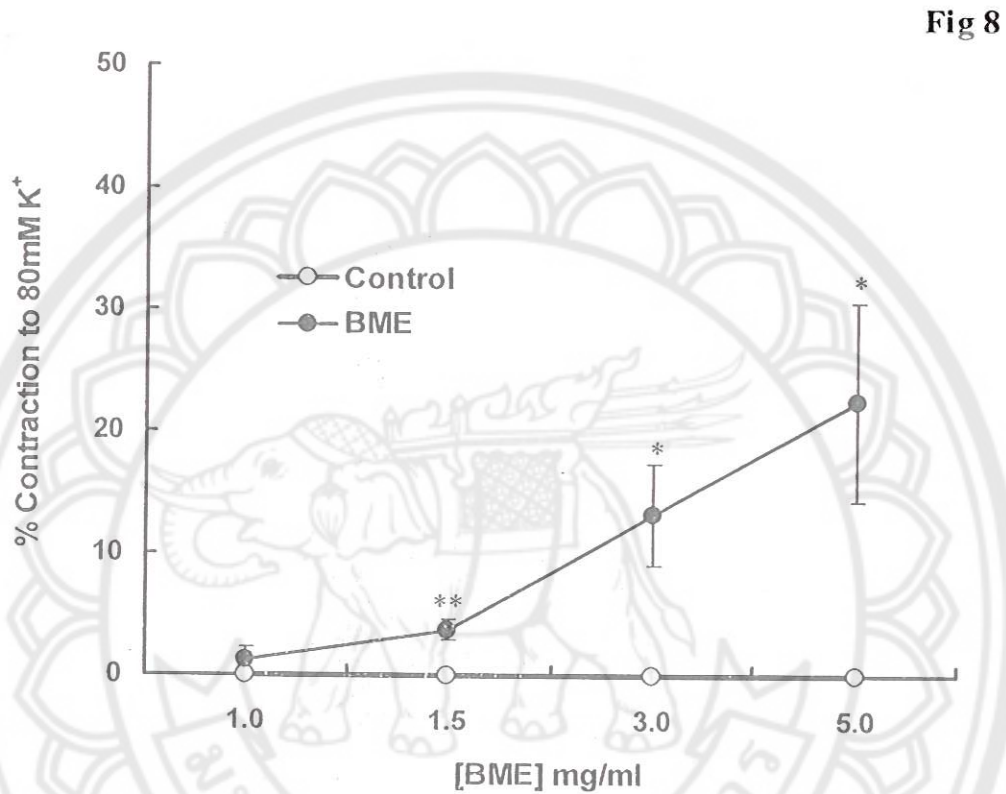
เมื่อแยกหลอดเลือดแดงออกมา แล้วนำหลอดเลือดแดงแขวนอยู่ใน organ bath หดตัวก่อนด้วยสาร 1 μM phenylephrine (PE) แล้วหยดสารสกัดพรมมิ พบว่าสารสกัดพรมมิตามความเข้มข้นต่างๆ (0.5-5.0 mg/ml) ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงขนาดเล็กที่ปราศจาก endothelium ซึ่งการคลายตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดพรมมิ (concentration-dependent manner) โดยหยดสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, และ 5.0 mg/ml ทำให้หลอดเลือดคลายตัว $5.87 \pm 1\%$, $13.85 \pm 3\%$, $27.37 \pm 5\%$, $40.24 \pm 6\%$, และ $61.39 \pm 7\%$ ตามลำดับ และความเข้มข้นที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างกลุ่มที่หยดสารสกัดพรมมิ และกลุ่มควบคุม คือความเข้มข้น 1.5, 3.0, และ 5.0 mg/kg (รูป 7)



รูป 7 ผลของสารสกัดพรมมิ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, และ 5.0 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดทางหนูจากการหดตัวก่อนด้วยสาร 1 μM phenylephrine (PE) ค่าต่างๆ คือ Mean \pm SEM (n = 6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่หยดสารสกัดพรมมิ และกลุ่มควบคุมที่หยดสารที่เป็นตัวทำลายสารสกัด

3. ผลของสารสกัดพรมมิ ต่อการหดตัวของหลอดเลือด

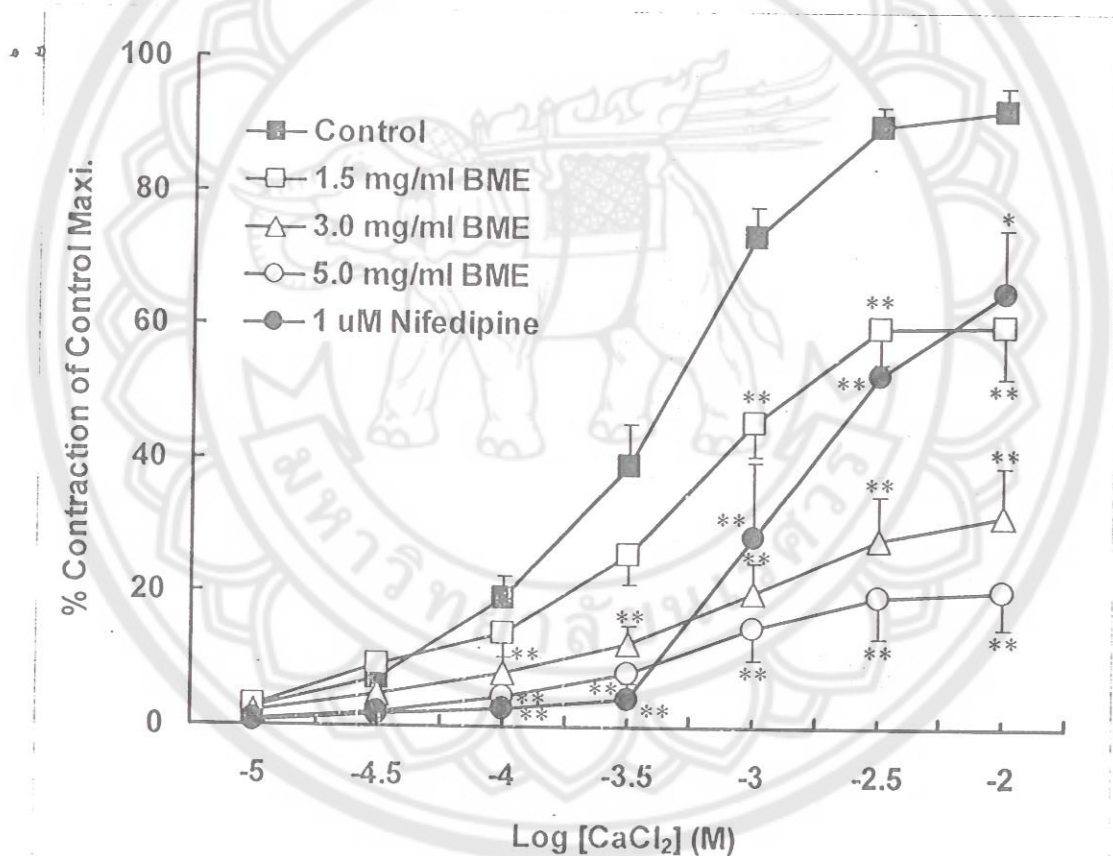
ขณะที่เมื่อหยดสารสกัดพรมมิ ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 3.0, และ 5.0 mg/ml ลงบนหลอดเลือดแดงที่แขวนอยู่ในสภาวะ resting tone พบว่าสารสกัดพรมมิ 1.5, 3.0, และ 5.0 ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ (รูป 8)



รูป 8 ผลของสารสกัดพรมมิ ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 3.0, และ 5.0 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การหดตัวของหลอดเลือดทางหลอดเลือดสูงสุด ที่แขวนอยู่ในสภาวะ resting tone ค่าต่าง ๆ คือ Mean \pm SEM (n = 6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่หยดสารสกัดพรมมิ และกลุ่มควบคุมที่หยดสารที่เป็นตัวทำลายสารสกัด

4. ผลของสารสกัดพรมมิ ต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์

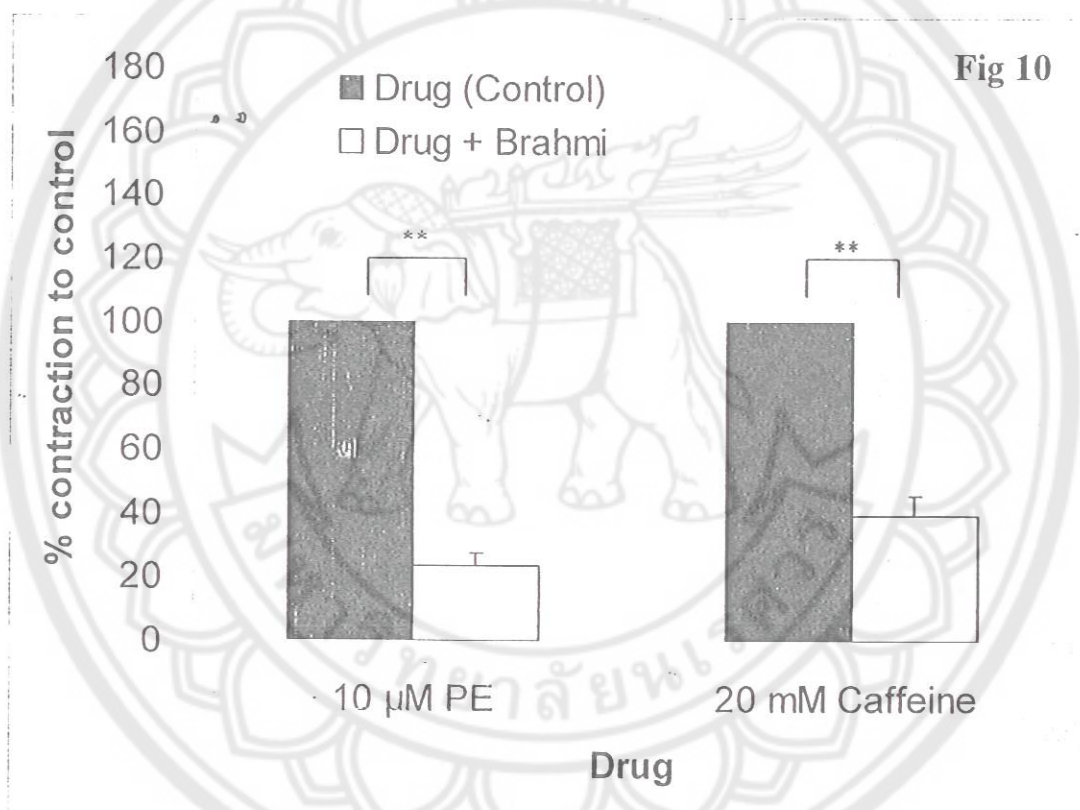
ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว พบว่าสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 1.5, 3.0 และ 5.0 mg/ml มีผลการหดตัวของหลอดเลือดแดงหางหนู ที่ถูกทำให้หดตัวด้วยการหยดสารละลาย CaCl_2 (0.01-10 mM) ในสถานะที่เปิดของประตูแคลเซียมอ็อกอน ด้วยสารละลายที่มี 80 mM K^+ และปราศจากแคลเซียม อย่างมีนัยสำคัญ โดยการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดพรมมิเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดพรมมิที่เพิ่มขึ้น แบบ concentration dependent manner เมื่อเทียบกับผลของสารสกัดพรมมิกับ 1 μM nifedipine ซึ่งเป็น Ca^{2+} channel blocker พบว่ามีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดไปในทำนองเดียวกัน(รูป 9) ดังนั้น สารสกัดพรมมิจึงมีผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือด ผ่านกลไกการยับยั้งการเปิดของประตูแคลเซียมอ็อกอน และลดการไหลเข้าของแคลเซียมจากนอกเซลล์เข้าในเซลล์ ซึ่งทำให้ผลสุดท้ายเกิดการคลายตัวของหลอดเลือด



รูปที่ 9 ผลของสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 1.5, 3.0, 5.0 mg/ml และ 1 μM nifedipine ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงหางหนู ด้วยการทำให้หลอดเลือดหดตัวโดยหยดสารละลาย CaCl_2 (0.01-10 mM) ในสถานะ Depolarization และกระตุ้นการเปิดของประตูแคลเซียมในสารละลายที่มี 80 mM K^+ และปราศจากแคลเซียม ค่าต่างๆ คือ Mean \pm SEM (n = 7), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่หยดสารสกัดพรมมิ และกลุ่มควบคุม

5. ผลของสารสกัดพรมมิ ต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum เข้าสู่ภายในเซลล์

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดพรมมิ ต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum เข้าสู่ภายในเซลล์ พบว่าการหดตัวของหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 10 μ M phenylephrine (PE) และ 20 mM Caffeine ในภาวะ Ca^{2+} -free Krebs ถูกยับยั้งโดยสารสกัดพรมมิ (5 mg/ml) ซึ่งสารสกัดพรมมิทำให้การหดตัวของหลอดเลือดโดยการเหนี่ยวนำของ PE ลดลงเหลือ 23.8 ± 3.71 % และโดยการเหนี่ยวนำของ Caffeine ลดลงเหลือ 39.5 ± 6.05 % (รูปที่ 10) ดังนั้นการสกัดพรมมิจึงมีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมภายในเซลล์ของหลอดเลือดทางหนูผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการปล่อยแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์



รูปที่ 10 ผลของสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 5.0 mg/ml ต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงหางหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 10 μ M phenylephrine หรือ 20 mM caffeine ในสถานะที่ปราศจากแคลเซียมภายนอกเซลล์ ค่าต่างๆ คือ Mean \pm SEM (n = 5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่หยดสารสกัดพรมมิ และกลุ่มควบคุม

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการวิจัยผลของสารสกัดพรมมีต่อความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจ พบว่าเมื่อฉีดสารสกัดพรมมีทางหลอดเลือดดำทำให้ความดันเลือด systolic และ diastolic ลดลง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ผลของสารสกัดพรมมีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดมีรายงานการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองพบว่าการฉีด (intravenous) สารสกัดพรมมีในหลากหลายรูปแบบของการสกัด ได้แก่ สารสกัด petroleum ether, dichloromethane, methanol และ สารสกัดน้ำในขนาด 25 mg/kg มีผลลดความดันในหนูที่ถูกทำให้สับสน โดยสารสกัดน้ำมีผลลดความดันได้สูงสุด แต่ทั้งหมดไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ (Chana et. al., 2003) สอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่า เมื่อฉีดสารสกัดพรมมี (Ethanollic *Bacopa monniera* extract) ที่ขนาด 20, 40 และ 60 mg/kg ทางหลอดเลือดดำ (intravenous) ทำให้ความดันเลือด systolic และ diastolic ลดลง ซึ่งการลดลงของความดันมากขึ้นตามขนาดที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดพรมมี (dose-dependent manner) และสารสกัดพรมมีไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ โดยปัจจัยที่ทำให้ความดันเลือดลดลง ได้แก่ การขยายตัวของหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก การลดความแรงในการบีบตัวของหัวใจ และหรืออัตราการเต้นของหัวใจลดลง ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดพรมมีทำให้ความดันเลือดลดลง อาจเกิดจากขยายตัวของหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อมาจึงใช้หลอดเลือดแดงหางหนู ซึ่งเป็น small artery เพื่อพิสูจน์ว่าสมุนไพรมมีมีผลต่อการทำให้หลอดเลือดคลายตัว

ผลการวิจัยผลของสารสกัดพรมมีต่อการทำงานของหลอดเลือดครั้งนี้ แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าสารสกัดสมุนไพรมมีมีผล โดยตรงต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบซึ่งทำให้เกิดการหดตัวหรือคลายตัวของหลอดเลือด ขณะที่พบว่าสารสกัดพรมมีทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด อย่างไรก็ตามสารสกัดพรมมีมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวชัดเจนกว่า เมื่อทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อนด้วย phenylephrine (α_1 -receptor agonist) แล้วหยดสารสกัดพรมมี พบว่าสารสกัดพรมมีทำให้หลอดเลือดคลายตัว และผลการคลายตัวมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดพรมมี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่สารสกัดพรมมีทำให้ความดันเลือดลดลงในหนูปกติเมื่อฉีดสารสกัดพรมมีเข้าหลอดเลือดดำ โดยเมื่อศึกษาถึงกลไกที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวเป็นกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน smooth muscle cells มีสมมุติฐาน ได้แก่ สารสกัดพรมมียับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์ จากการศึกษาในหลอดเลือดแดงหางหนูครั้งนี้ พบว่าสารสกัดพรมมีมีผลทั้งในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์ สำหรับการศึกษเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมี มีรายงานว่าสารสกัดพรมมีมีผลยับยั้งการไหลของแคลเซียมจากภายนอกเข้าสู่

ภายในเซลล์ของหลอดเลือด pulmonary artery และหลอดเลือด aorta ของกระต่าย แต่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมภายในเซลล์จากการตอบสนองของหลอดเลือดที่มีต่อ caffeine หรือ noradrenaline (Dar & Channa, 1999) ซึ่งรายงานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดพรมมีมีผลยับยั้งการไหลของแคลเซียมจากนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ของหลอดเลือด artery ที่แยกมาจากหางหนู ซึ่งเทียบเคียงได้กับผลของ nifedipine (Ca^{2+} channel blocker) ในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ผ่าน Ca^{2+} channel ทำให้เห็นการลดลงของการหดตัวของหลอดเลือดที่เหนียวมาจากแคลเซียมเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามผลการวิจัยครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับผลการเคลื่อนที่ของแคลเซียมภายในเซลล์ โดยพบว่าสารสกัดพรมมีมีผลยับยั้งการไหลของแคลเซียมออกจาก sarcoplasmic reticulum ต่อการตอบสนองของหลอดเลือดที่มีต่อ caffeine และ phenylephrine (PE) อย่างชัดเจนในภาวะ Ca^{2+} -free ซึ่งการเหนียวทำให้แคลเซียมเคลื่อนที่จาก sarcoplasmic reticulum (SR) โดย caffeine เหนียวนำผ่าน ryanodine receptors และ phenylephrine เหนียวนำผ่าน IP_3 receptors บน sarcoplasmic reticulum ซึ่งสารสกัดพรมมียับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมในกลไกดังกล่าว

เพื่อพิสูจน์ว่า สารสกัดพรมมีและสารสำคัญของพรมมี มีผลโดยตรงต่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว จึงทำการแยกเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ แล้วศึกษาเชิงลึกในผลของสารสกัดพรมมี และสารสำคัญของสารสกัดพรมมี ที่มีต่อประตูดแคลเซียมอออน (calcium channel) ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกมาจากหลอดเลือดแดงจากหางหนู พบว่าเมื่อหยดสารสกัดพรมมี (10, 100 $\mu\text{g/ml}$) และ Enrichment Saponins (10 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งเป็นกลุ่มสารสำคัญของสารสกัดพรมมีลงบนเซลล์ ทำให้ L-type Ca^{2+} currents ผ่านประตูดแคลเซียมอออน (L-type Ca^{2+} channel) เข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลดลง จึงแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารสกัดพรมมี มีสารสำคัญ Enrichment Saponins ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ออกใช้สารสำคัญหนึ่งที่เป็น pure compound ใน Enrichment Saponins คือ Bacopaside I (10 $\mu\text{g/ml}$) พบว่าไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารสำคัญอื่นๆใน Enrichment Saponins ของสารสกัดพรมมี เช่น Bacoside A₃, Bacopaside II, Bacopasaponin C หรือ Bacopasaponin C isomer ทำให้เกิดการลดลงของ L-type Ca^{2+} currents ผ่านประตูดแคลเซียมอออนเข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งในการวิจัยขั้นต่อไปควรศึกษาต่อในการหาว่าสารสำคัญที่เหลือนี้มีผลต่อ L-type Ca^{2+} currents โดยตรง

จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดพรมมีมีประสิทธิภาพในการลดความดันในหนูปกติ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการลดอัตราการเต้นของหัวใจ และสารสกัดพรมมีทำให้หลอดเลือดแดงขนาดเล็กคลายตัว การคลายตัวของหลอดเลือดดังกล่าวเป็นผลจากการยับยั้งการไหลเข้าของแคลเซียมอออน ผ่านประตูดแคลเซียมอออน ในการศึกษาสารสำคัญของสารสกัดพรมมีแสดงให้เห็นว่ามี

สารสำคัญอย่างน้อยหนึ่งสารสำคัญ ที่ต้องสามารถยับยั้ง L-type Ca^{2+} currents ผ่านประตูละอองเชื่อมอิมออน (L-type Ca^{2+} channel) เข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ



บรรณานุกรม

- Bureau of Non Communicable Disease. (2006). Number and death rates per 100,000 population of first 10 leading cause groups of groups of death 1997-2006. **Health Information Unit**, Bureau of Health Policy and Strategy.
- Channa, S. Dar, A., Yaqoob, M., Anjum, S., Sultani Z., Rahman, A. (2003). Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera*. **Journal of Ethnopharmacology**, 86, 27-35.
- Channa, S., Dar, A., Anjum, S., Yaqoob, M., Rahman, A. (2006). Anti-inflammatory activity of *Bacopa monniera* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 104, 286-289.
- Dar, A. and Channa, S. (1997). Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. **Phytotherapy Research**, 11, 323-325.
- Dar, A. and Channa, S. (1999). Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. **Journal of Ethnopharmacology**, 167-174.
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S., Singh, H.K. (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 73, 893-900.
- Ezzati, M., Lopez, A.D., Rodgers, A., Vander Hoon, S., Murray, C.J., Comparative Risk Assessment Collaborating Group. (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet**, 360, 1347-1360.
- Hota, S.K., Barhwal, K., Baitharu, I., Prasad, D., Singh, S.B., Ilavazhagan, G. (2009). *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. **Neurobiology of Disease**. doi:10.1016/j.nbd.2008.12.006.
- Nadkarni, K.M. (1976). Popular Prakashan Private. **Indian Materia Medica**. Bombay, 624-625.
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R.K., Bhattacharya, K. (2002). Antidepressant activity of a standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. **Phytomedicine**, 9, 207-211.

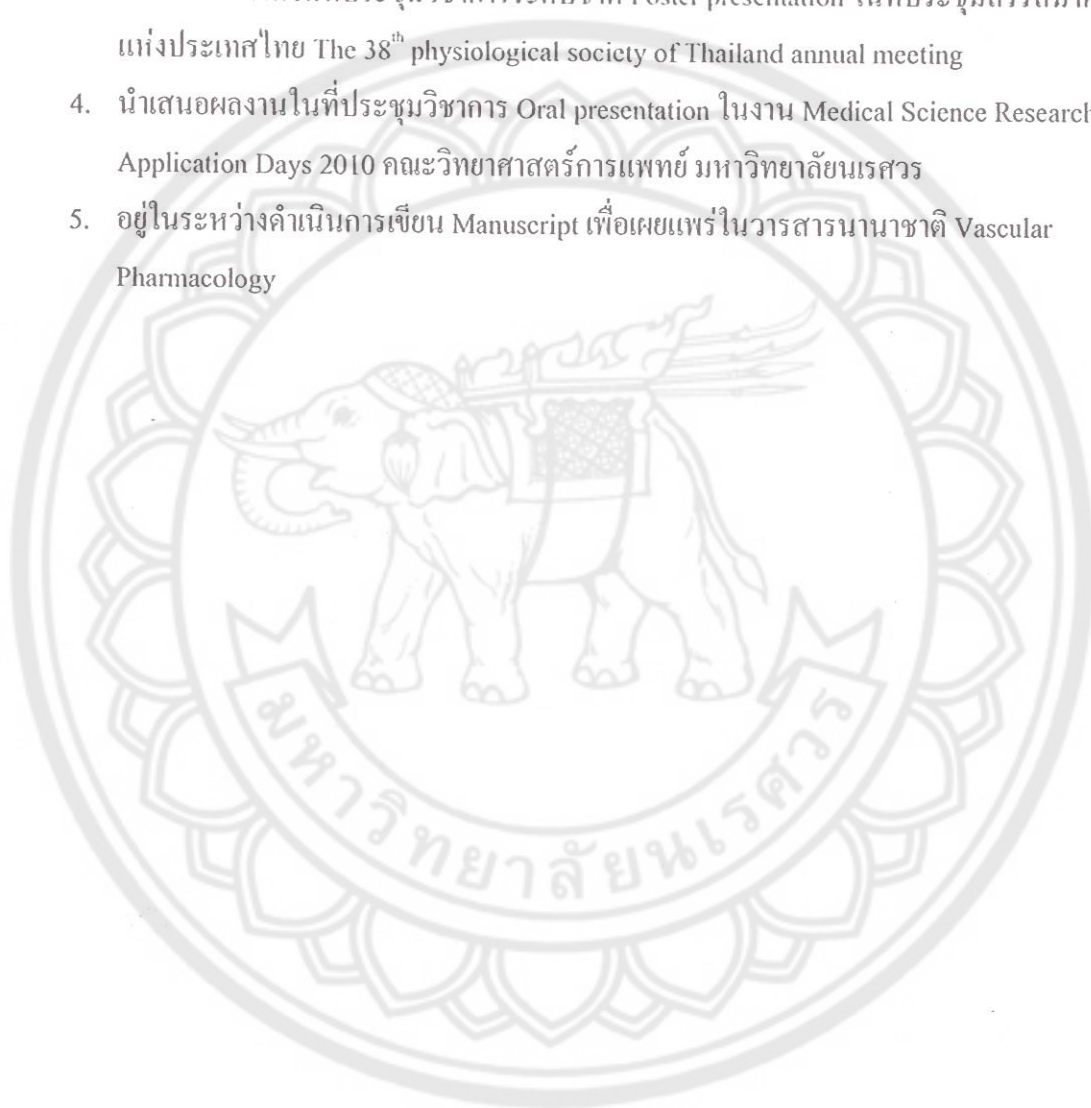
- Singh and Dhawan. (1982). H.K. Singh and B.N. Dhawan, Effect of *Bacopa monniera* extract on avoidance responses in rat, **Journal of Ethnopharmacology**, 5, 205–214.
- Singh, H.K., Dhawan, B.N. (1997). Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic *Bacopa monniera* Linn (Brahmi). **Indian Journal of Pharmacology**, 29, 359–365.
- Stough C, Lloyd J, Clarke J, Downey LA, Hutchison CW, Rodgers T, and Nathan PJ, (2001). The chronic effect of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. **Psychopharmacology**, 1-6.





Output ที่ได้จากโครงการ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับสรรพคุณของสมุนไพรพรมมิ และสารสำคัญ ด้านการตอบสนองของระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมิต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบสำหรับการศึกษาวิจัยในขั้นสูงต่อไป
3. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ Poster presentation ในที่ประชุมสรีรสมาคมแห่งประเทศไทย The 38th physiological society of Thailand annual meeting
4. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ Oral presentation ในงาน Medical Science Research Application Days 2010 คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
5. อยู่ในระหว่างดำเนินการเขียน Manuscript เพื่อเผยแพร่ในวารสารนานาชาติ Vascular Pharmacology



ภาคผนวก

Manuscript

TITLE: Pharmacological actions of *Bacopa monniera* and its active compounds on rat cardiovascular system

AUTHORS: Natakorn Kamkaew^a, C. Norman Scholfield^b, Kornkanok Ingkaninan^c, Krongkarn Chootip^d

INSTITUTIONS:

^aFaculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

^bThe graduate school, Narasuan, Phitsanulok 65000, Thailand

^cDepartment of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

^dDepartment of Physiology, Faculty of Medical Science, Phitsanulok 65000, Naresuan University, Thailand

CORRESPONDING AUTHOR:

Krongkarn Chootip, PhD

Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University

T. Tapoo, A. Muang, Phitsanulok 65000, Thailand.

Tel: +66-55-964602

Fax: +66-55-964770

Email: krongkarnc@nu.ac.th

Abstract

Aim of the study: This study was aimed to examine cardiovascular effects of *Bacopa Monniera* extract (BME) and its active compounds.

Materials and Methods: An acute effect of intravenous injection of BME (20, 40, and 60 mg/kg) on blood pressure and heart rate in normotensive anesthetized rats were measured by cannulation. Isolated denuded rat tail arteries were mounted in an organ bath system to evaluate the vascular relaxation effects of BME (0.1-5.0 mg/ml) on precontracted PE. The vascular smooth muscle cells were isolated from rat tail arteries. L-type Ca^{2+} currents ($I_{\text{Ca(L)}}$) were measured by using patch clamp to evaluate effects of 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ BME, high saponin (group of *Bacopa monniera* active compounds), and Bacopaside I (pure compound of *Bacopa Monniera*).

Results: Intravenous injection of BME caused a dose-dependent decrease in systolic blood pressure (Ps) and diastolic blood pressure (Pd) in normotensive anesthetized rats, but did not change heart rate. In vascular study, BME (0.1-5.0 mg/ml) induced relaxation in concentration-dependent manner in endothelium-denuded arteries precontracted by PE. The BME concentration 1.5, 3.0, and 5.0 mg/ml cause significant-different vasorelaxation as comparison to controls. In vascular smooth muscle cell study showed the decreased inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents which were occurred by adding BME, high saponin. Despite these Bacopaside I did not cause decrease of inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents. These results suggest that the others of its pure compounds, such as Bacoside A₃, Bacopaside II, Bacopasaponin C isomer, or Bacopasaponin C cause decrease of inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents.

Conclusions: We found that BME has effects to decrease systolic and diastolic blood pressure, whereas does not effect on heart rate, suggesting that the hypotension may be due to relaxation of vascular smooth muscle. The vascular study verifies that BME has relaxation on the rat tail artery. The relaxation may be mediated by blocking of L-type VDCCs to decrease Ca^{2+} influx into vascular smooth muscle cells. In isolated vascular smooth muscle cells study verifies that BME and high saponin partially blocked L-type VDCCs which reduce Ca^{2+} influx, but did not produce any effects by bacopaside I. Further studies need to find the active compounds to cause the pronounced effect of hypotension, and investigate other possible underlying mechanisms.

Keywords: *Bacopa monniera* extract; blood pressure; heart rate; vasorelaxation; cannulation; organ bath; patch clamp; rat tail artery; High saponin; bacopaside I; L-type Ca^{2+} currents; L-type voltage dependent-calcium channel

1. Introduction

Cardiovascular diseases are the number one cause of death. An estimated 17.5 million people died from cardiovascular disease in 2005, representing 30 % of all global deaths (who.int/cardiovascular_diseases). In Thailand, cardiovascular disease was the first leading cause of death in 1997 to 2000 (Bureau of Non Communicable Disease, 2006). High blood pressure is the leading risk factor for mortality around the world, and lowering blood pressure greatly reduces the main risk for developing arterial coronary disease, heart failure, cerebral vascular disease, and renal damage (Ezzati et al., 2002). Recently, the interest of the general public in the use of dietary herbs has risen exponentially, due to their presumed low toxicity and good therapeutic performance, so one of the most interesting pharmacological studies is the effect of herbal medicines on cardiovascular system.

Bacopa monniera or *Bacopa monnieri* is medicinal plant, locally called 'Brahmi' (Dar et al., 1998). It has a number of uses in Ayurveda which is a traditional treatment for epilepsy and asthma (Rajani et al., 2004). They were found in wet area of Indo-Pakistan (Nadkarni, 1976) and in north-eastern of Thailand. The pharmacological activities have been primarily attributed to the saponin compounds present in the alcoholic extract of the plant. The major chemical constituents that have been isolated and characterised from *Bacopa monnieri* are all dammarane-type triterpenoid saponins and include pseudojubilogenin glycosides and jubilogenin glycosides (Garai et al., 1996; Hou et al., 2002; Chakravarty et al., 2003). The initial chemical investigations of two saponins, designated as bacosides A and B (Chatterjee et al., 1963, 1965 and Basu et al., 1967), and designated as Bacopaside I, II, III, IV, V (Chakravarty et al., 2001; 2003). Saponins were reported to be responsible for the cognitive enhancing activity in Bruhmi (Das et al., 2002; Sairam et al., 2002). Neuronal studies indicate that *Bacopa monniera* extract (BME) improves memory capacity, motor learning ability (Das et al., 2002; Rajani et al., 2004), memory functions in hypobaric hypoxia (Hota et al., 2009), and antidepressant activity on rats (Sairam et al., 2002), and anti-inflammatory activity (Channa et al., 2005). Clinical studies indicate that BME has antianxiety effect (Rajani et al., 2004) and has chronic effect to improve cognitive function in healthy human (Stough et al., 2001). However, cardiovascular system is important due to this system has function to deliver blood supplying for every parts of body, including the brain. Recently, ethanol BME has been shown to have relaxant effects on smooth muscle consist of gut such as ileum of guinea-pig and jejunum of rabbit, on respiratory smooth muscle such as trachea and bronchioles of guinea-pig, and on vascular smooth muscle such as pulmonary arteries of guinea-pig and rabbit, aorta of rabbit (Dar et al., 1997; 1999). The broncho-vasodilatory activities of most active fractions are mediated by interference with Ca^{2+} ion movement (Channa et al., 2003).

However, the effects of BME on blood pressure (BP) and heart rate (HR) have not been clarified. Therefore in this study, we used the cannulation technique to study the acute effect of BME on BP and HR. Moreover, the effects of BME and bacopaside I, its active compound, on rat tail artery isolated smooth muscle cells have not been studied. Therefore, we used patch clamp technique to study this effect.

2. Material and methods

2.1. Chemical and drugs

2.1.1. The crude extracts of *Bacopa monniera* preparation

Aerial part of *Bacopa monniera* was collected from Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University Phitsanulok Thailand which was provided by Assoc.Prof.Dr. Kornkanok Ingkaninan, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

Bacopa monniera was air dried and dehydrated (55°C) and then crushed to be crude. It was extracted with 95% Ethanol by Thai-China Flavours and Fragrances Industry Company. The BME were dissolved in heparinized saline to prevent clotting of blood for the cannulation and vascular study, and dissolved in distilled water for patch clamp.

2.2. Preparation of rats

2.2.1 Preparation of rats for cannulation

Male Wistar rats (200-250g) were used for all experiments. Animals were bought from National Laboratory Animal Centre, Mahidol University. Animals were housed under standard environmental condition at 25 ± 5 °C, 12 hrs light & dark cycle, fed with rodent diet and tap water in Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University.

The rats were anaesthetized with thiopental sodium (50 mg/kg BW) by intraperitoneal (i.p.) injection. Forelimbs and hind limbs were fixed on the operating pad with adhesive tape. The femoral triangle, consisting of femoral nerve, femoral artery and femoral vein, was exposed by skin incision. Femoral vein and artery were cannulated with polyethylene tube (PE 50) for the infusion of experimental drugs and measurement of blood pressure, respectively.

2.2.2 Preparation of denuded rat tail arteries

Male wistar rats (200-250g) were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium overdose. The rat tail artery was isolated and placed into freshly prepared Krebs' solution, composed of (mM): NaCl, 122; KCl, 5; [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine N'-(2-ethanesulfonic acid)] HEPES, 10; KH_2PO_4 , 0.5; NaH_2PO_4 , 0.5; MgCl_2 , 1; glucose, 11; and CaCl_2 , 1.8 (pH 7.3). Adherent fat and surrounding tissue were cleaned off. The rat tail artery was cut into rings approximately 0.5 cm in length. The rings were rubbed the intimal surface to be rings with the endothelium denuded. The rings were mounted on pair of wires in organ chambers containing 2 ml Krebs' solution at 37°C and aerated. The vessel segments were allowed to equilibrate for 1 hr at a resting tension of 1 g. During the equilibration period, the solution was replaced every 15 min. Changes in isometric force were measured using a MacLab data acquisition system (Analogue Digital Instruments, Sydney, Australia).

2.2.3 Preparation of vascular smooth muscle cells from rat tail arteries for patch clamp

Male Sprague Dawley rats (200-250g) conformed to UK Home office Regulations and the principles set out in the Guide for the Care and Use of Laboratory

Animals (National Academy of Sciences 1996). The rats were terminated by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium overdose. Segments of the rat tail artery were excised and put into calcium free Hank's solution. They were then cleaned of adhering tissue, and cut open into small strips. The tissues were transferred into a tube filled with dissociation medium (DM) solution, composed of (mM); NaCl, 110.0; KCl, 5.0; KH_2PO_4 , 0.5; NaH_2PO_4 , 0.5; NaHCO_3 , 10.0; HEPES, 10.0; phenol red, 0.03; taurine, 10.0; ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5; and MgCl_2 , 2.0 (pH 7.0). The tissues were incubated at 4 °C in the presence of 0.8 mg/ml papain, 0.04% bovine serum albumin (BSA) and 0.4 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) for 30 min, and then incubated at 37 °C for 15 min. After that 0.8 mg/ml collagenase were added and the tissues were further incubated for 10 min. The tissues were transferred into fresh DM, triturated with pasture pipette until the smooth muscle cells were isolated from tissues. The cells were kept in 4 °C for further use in patch clamp recording.

2.3. Experimental protocols

2.3.1 Protocol 1; effect of BME on BP and HR on normotensive anesthetized rats

A polyethylene catheter was inserted into the femoral artery for pressure recordings. Another catheter was inserted into femoral vein for administration of drugs. Both catheters were filled with heparinized saline. The arterial catheter was connected to pre-calibrated pressure transducer and pressure outputs were recorded in an amplifier-recorder connected to a personal computer equipped with an analog to digital converter board, Maclab A/D converter (Chart v4; A.D. Instruments, Castle Hill, Australia). After cardiovascular parameters had stabilized, BP was recorded before and after i.v. administration of BME dose 20, 40, 60 mg/kg BW. HR was calculated from counting of the pressure signal. Successive injections were separated by a time interval sufficient to allow full recovery of cardiovascular parameters.

2.3.2 Protocol 2; effect of BME on rat tail arterial contraction induced by PE

This study attempt was to verify BME-induced relaxation. 10^{-6}M PE was used to induce a steady contraction in rings with the endothelium denuded, and BME was added cumulatively (0.1-5.0 mg/ml). The BME-induced concentration-dependent relaxation in arterial rings was calculated as percentage of the contraction in response to PE.

2.3.3 Protocol 3; effect of BME and its active compounds on vascular smooth muscle cells using perforated patch-clamp recording

Isolated rat tail arterial cells were dropped into the chamber and allowed to settle down for 5-10 min, then perfused with Hank's solution, composed of (mM); glucose, 5.0; HEPES, 5.0; KCl, 5.0; MgCl_2 , 1.3; NaCl, 140.0; CaCl_2 , 2.0 (pH 7.4) at 37 °C. The whole-cell perforated patch clamp method was employed to voltage-clamp smooth muscle cells. Recording electrodes were created a pipette resistance of 4–8 M Ω when filled with CsCl pipette solution, composed of (mM); CsCl, 125.0; HEPES, 10.0; EGTA, 11.0; MgCl_2 , 2.0; CaCl_2 , 1.0 (pH 7.4) which contained 200 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B. The amphotericin B stock solution was prepared every week at 4 mg/ml in dimethyl sulfoxide (DMSO), stored at -20 °C, and protected from light. Fresh perforated-patch pipette solution was prepared every day by addition of 10 μl stock amphotericin B solution to 200 μl intracellular CsCl pipette solution. L-type Ca^{2+} currents ($I_{\text{Ca(L)}}$) were measured from a holding potential of -80mV. $I_{\text{Ca(L)}}$ were

generated by 10 mM BaCl₂ in Hank's solution and depolarizing voltage steps of 300 ms duration. Once $I_{Ca(L)}$ had reached steady values (control), cell was exposed to 10 mM BaCl₂ plus 10 µg/ml BME, then washed by 10 mM BaCl₂ in Hank's solution. 10 mM BaCl₂ plus 100 µg/ml BME, 10 mM BaCl₂ plus 10 µg/ml high saponin, 10 mM BaCl₂ plus 10 µg/ml Bacopaside I, and 10 mM BaCl₂ plus 1 µM nicardipine were added to the cell, respectively. Each drug was separated by 10 mM BaCl₂ in Hank's solution. The chamber was filled under the continuous flux of Hank's solution. Data were accomplished using whole cell program WCP for windows V3.6 (winWCP) Software, developed by University of Strathclyde.

2.4 Data analysis

All data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM.). Statistical analysis and significance are appropriately measured using SPSS data analysis software, compose of Pair Student t-test for the significance of BP or HR differences between before and after drugs injection in the same dose, and ANOVA was used to analyse the significance of different doses. In all comparisons, *P* values less than 0.05 were considered significant.



3. Results

3.1. High saponins from BME analyzed by HPLC

A chromatogram of high saponin (group of active compounds) from 5mg/ml BME was analyzed by HPLC, showed the most active compounds of *Bacopa moniera*. 5% of total saponins were found from BME which five active compounds, consist of Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopasaponin C isomer, Bacopasaponin C, and Bacopaside I were detected and compared to standard pure compound (Fig. 1).

3.2. Effect on blood pressure and in heart rate in normotensive anesthetized rat

Intravenous administration of BME caused a dose dependent decrease in systolic blood pressure (Ps) and diastolic blood pressure (Pd) at 20, 40, and 60 mg/kg in normotensive anesthetized rats. The fall in Ps and Pd were transiently decreased after each dose and a return to normal within a minute, whereas saline did not cause decrease of Ps and Pd (Fig. 2A). The Ps were expressed as doses of 20, 40, and 60 mg/kg BME at before and after injection; 134.02±5.00, 115.22±5.04; 138.02± 8.86, 104.81±9.74; 143.93±12.13, 94.98±5.38 mmHg, respectively, and the same trend in Pd; 97.64±4.11, 78.67±3.79; 99.81±4.80, 67.14±7.48; 100.36±6.23, 57.02±8.84 mmHg, respectively (Fig. 2B). Although blood pressure was decreased, but heart rate was not changed under the same experimental conditions, which was expressed as doses of 20, 40, and 60 mg/kg BME at before and after injection; 418±11.92, 414±8.01; 429±15.36, 417 ±16.13; 452±18.77, 447±23.70 BPM, respectively (Fig. 2C).

3.3. Concentration-dependent relaxation effect of BME

BME (0.1-5.0 mg/ml) induced relaxation in concentration-dependent manner in endothelium-intact arteries precontracted by PE (Fig. 3A). The vasorelaxation of arteries was expressed as percentage of contraction to 10^{-6} PE at different concentration 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, and 5.0 mg/ml BME; 90.14±1.76, 84.81±1.79, 77.90±2.66, 66.66±3.98, 55.86±5.07, and 37.47±6.12; respectively. The BME concentration 1.5, 3.0, and 5.0 mg/ml cause significant-different vasorelaxation as comparison to controls.

3.4. Effect of BME and its active compounds on vascular smooth muscle cells

The inward currents were elicited by 300-ms step pulses to 10 mV from a holding potential of -80 mV (Fig. 2A). The inward currents, which were generated by 10 mM BaCl₂, $I_{Ca(L)}$ were decreased by adding of 10µg/ml BME, 100µg/ml BME, 10µg/ml high saponin, and 1µM nicardipine to the cells (Fig. 4A). These inward currents were expressed as peak of current divided with cell capacitance before and after added the drugs which are 10µg/ml BME, 100µg/ml BME, 10µg/ml high saponin, 10µg/ml Bacopaside I and 1µM nicardipine: 4.35±0.53, 2.88±0.48; 4.11±0.39, 2.19±0.27; 4.33±0.35, 3.09±0.31; 3.15±0.53, 4.25±1.03; 4.52±0.10, 1.16±0.81 pA/pF, respectively. The inward currents were concentration dependent decreased by 10µg/ml and 100µg/ml BME. The same effect as 10µg/ml high saponin, and 1µM nicardipine, but did not cause decrease by 10µg/ml Bacopaside I (Fig 4B).

4. Discussion

The BP and HR study indicated that BME caused dose dependent decreased of blood pressure (BP). The rapidly BP recovery may be due to the pharmacokinetic of extract which was distributed, metabolized, and excreted, so the extract concentration was rapidly reduced from the blood, moreover may be due to short term regulation of BP by the baroreceptor reflex, negative feedback reflex, and autoregulation of BP via stretch receptors. Therefore, the extract might be useful in treatment of hypertension. There were not any effects on heart rate, suggesting that the hypotension may be due to relaxation of vascular smooth muscle.

In order to verify the relaxation effect of BME, the present study applied PE to induce contraction. PE activates the intracellular Ca^{2+} release following an increase of PIP_2 and IP_3 . The results examined that BME relaxed the artery precontracted with 10^{-6}M PE in endothelium denuded isolated tissue in a manner of concentration dependence. The results suggest that EME acted through smooth muscle cells. The BME relaxed the contraction induced by PE, suggesting that a mechanism is inhibition of α_1 -adrenergic receptor and Ca^{2+} -dependence on vascular smooth muscle involvement. The relaxation may be mediated by blocking of L-type VDCCs to decrease Ca^{2+} influx into vascular smooth muscle cells.

The vascular smooth muscle cells study showed that the inward currents were generated by 10 mM BaCl_2 , and nearly abolished by $1\mu\text{M}$ nicardipine (L-type Voltage-dependent calcium channel). These results suggest that the recorded inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents were Ba^{2+} currents mostly carried by L-type Voltage-dependent calcium channel. The decreased inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents were occurred by adding BME, Saponin (active compounds of *Bacopa monniera*), but despite these Bacopaside I (one of its pure compounds) did not cause decrease of inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents. These results suggest that the others of its pure compounds, such as Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopasaponin C isomer, or Bacopasaponin C cause decrease of inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents.

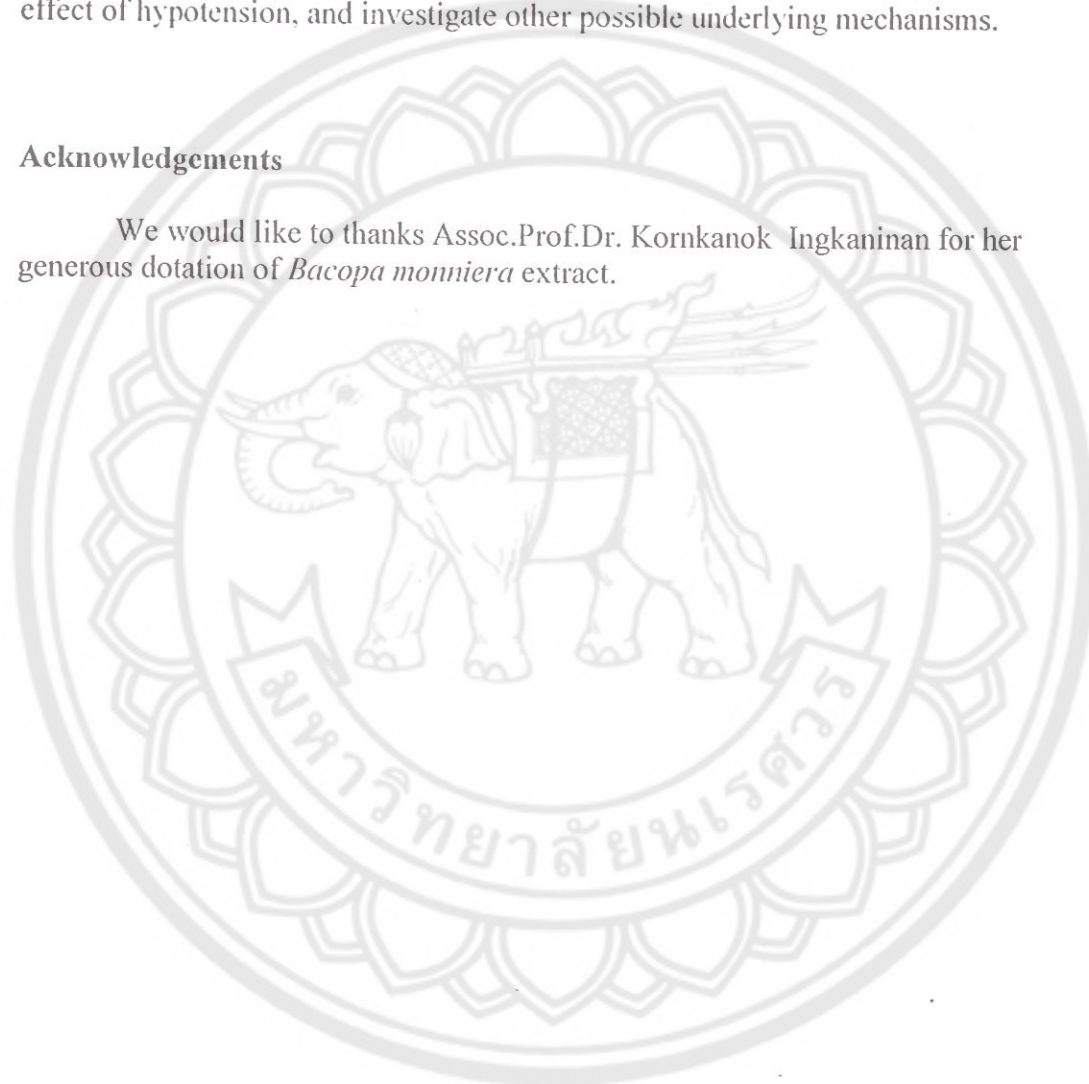
5. Conclusions

We found that BME has effects to decrease systolic and diastolic blood pressure, whereas does not effect on heart rate, suggesting that the hypotension may be due to relaxation of vascular smooth muscle. The vascular study verifies that BME has relaxation on the rat tail artery. The relaxation may be mediated by blocking of L-type VDCCs to decrease Ca^{2+} influx into vascular smooth muscle cells. In isolated vascular smooth muscle cells study verifies that BME and high saponin partially blocked L-type VDCCs which reduce Ca^{2+} influx, but did not produce any effects by bacopaside I.

Further studies need to find the active compounds to cause the pronounced effect of hypotension, and investigate other possible underlying mechanisms.

Acknowledgements

We would like to thanks Assoc.Prof.Dr. Kornkanok Ingkaninan for her generous dotation of *Bacopa monniera* extract.



References

http://www.who.int/cardiovascular_diseases (Retrieved September 1, 2009)

Basu, N., Rastogi, R.P., Dhar, M.L., 1967. Chemical examination of *Bacopa monnieri* Wettst Part III – bacoside B. *Indian J. Chem.* 5, 84–86.

Bureau of Non Communicable Disease, 2006. Number and death rates per 100,000 population of first 10 leading cause groups of groups of death 1997-2006. Health Information Unit, Bureau of Health Policy and Strategy.

Chakravarty, K.A., Sarkar, T., Masuda, K., Shiojima, K., Nakane, T., Kawahara, N., 2001. Bacopaside I and II: two pseudojubilogenin glycosides from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 58, 553-556.

Chakravarty, K.A., Garai, S., Maslda, K.N., Nakane, T., Kawahara, N., 2003. Bacopasides III-V: triterpenoid glycosides from *Bacopa monniera*. *Chem Pharm Bull* 51, 215–217.

Chatterjee, N., Rastogi, R.P., Dhar, M.L., 1963. Chemical examination of *Bacopa monniera* Wettst.: Part I – Isolation of chemical constituents. *Indian J. Chem.* 1, 212–215.

Chatterjee, N., Rastogi, R.P., Dhar, M.L., 1965. Chemical examination of *Bacopa monniera* Wettst.: Part II – The constitution of Bacoside A. *Indian J. Chem.* 3, 24–29.

Channa, S., Dar, A., Yaqoob, M., Anjum, S., Sultani Z., Rahman, A., 2003. Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera*. *Journal of Ethnopharmacology* 86, 27–35.

Channa, S., Dar, A., Anjum, S., Yaqoob, M., Rahman, A., 2006. Anti-inflammatory activity of *Bacopa monniera* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 286-289.

Dar, A. and Channa, S., 1997. Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. *Phytotherapy Research* 11, 323–325.

Dar, A., Channa, S., 1999. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *Journal of Ethnopharmacology*, 167-174.

Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S., Singh, H.K., 2002. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73, 893-900.

Ezzati, M., Lopez, A.D., Rodgers, A., Vander Hoom, S., Murray, C.J., Comparative Risk Assessment Collaborating Group, 2002. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 360, 1347-1360.

- Garai, S., Mahato, B.S., Ohtani, K., Yamasaki, K., 1996. Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 42, 815–820.
- Hota, S.K., Barhwal, K., Baitharu, I., Prasad, D., Singh, S.B., Ilavazhagan, G., 2009. *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. *Neurobiology of Disease*.
- Hou, C.C., Lin, S.J., Cheng, J.T., Hsu, F.L., 2002. Bacopaside III, bacopasaponin G and bacopasides A, B and C from *Bacopa monniera*. *J Nat Prod* 65, 1759–1763.
- Nadkarni, K.M., 1976. *Indian Materia Medica*. Popular Prakashan Private, Bombay, pp. 624-625.
- Rajani, M., et al., 2004. Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Pennell) – A *Medhya Rasaayana* Drug of Ayurveda in Ramawat, K. G., Ed. *Biotechnology of Medicinal Plants: Vitalizer and Therapeutic Enfield*, New Hampshire: Science Publishers, Inc.
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R.K., Bhattacharya, K., 2002. Antidepressant activity of a standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine* 9, 207-211.
- Stough et al., 2001. The chronic effect of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology*, 1-6.

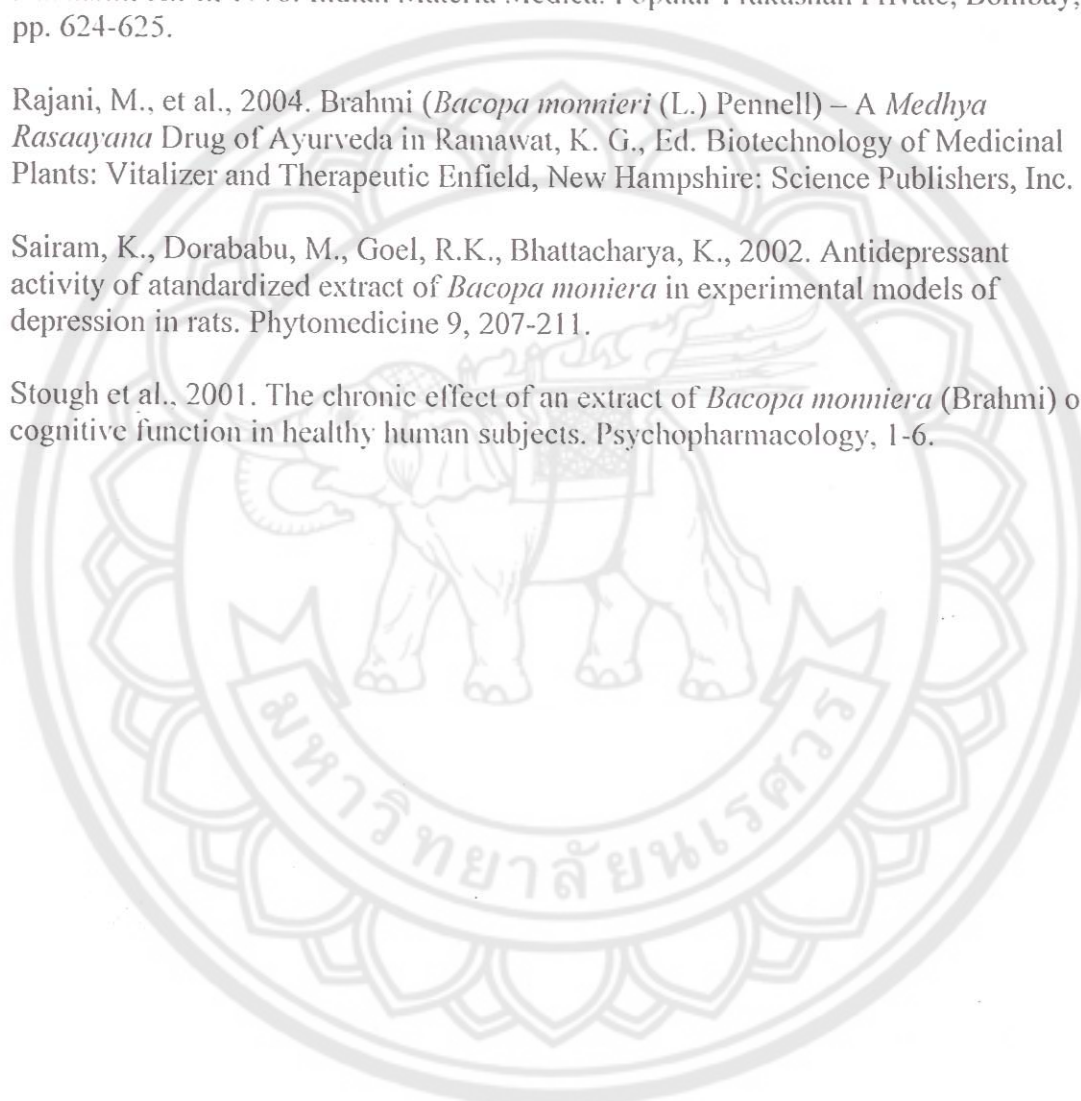


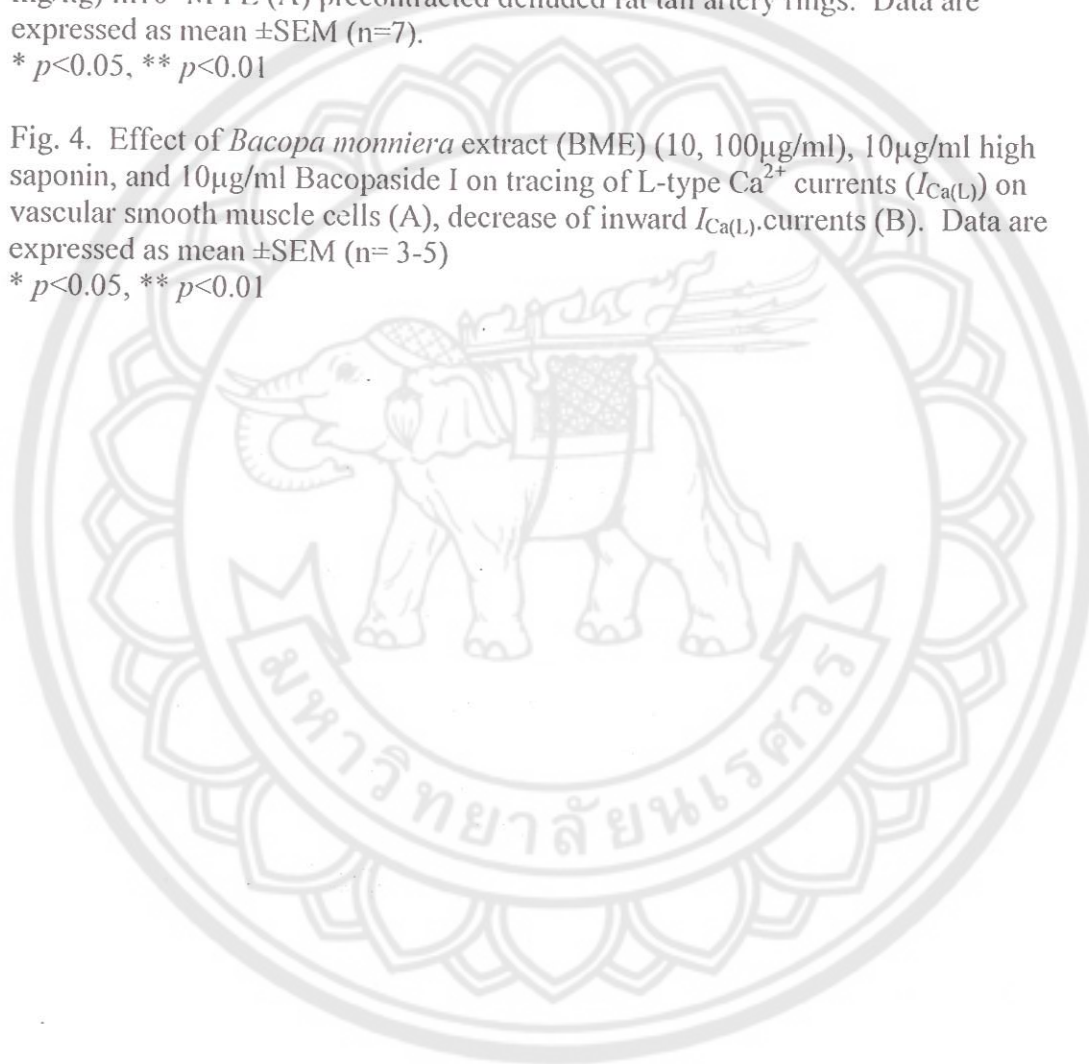
Figure legends

Fig. 1. Chromatogram of high saponin from 5mg/ml *Bacopa monniera* extract (BME) analyzed by HPLC.

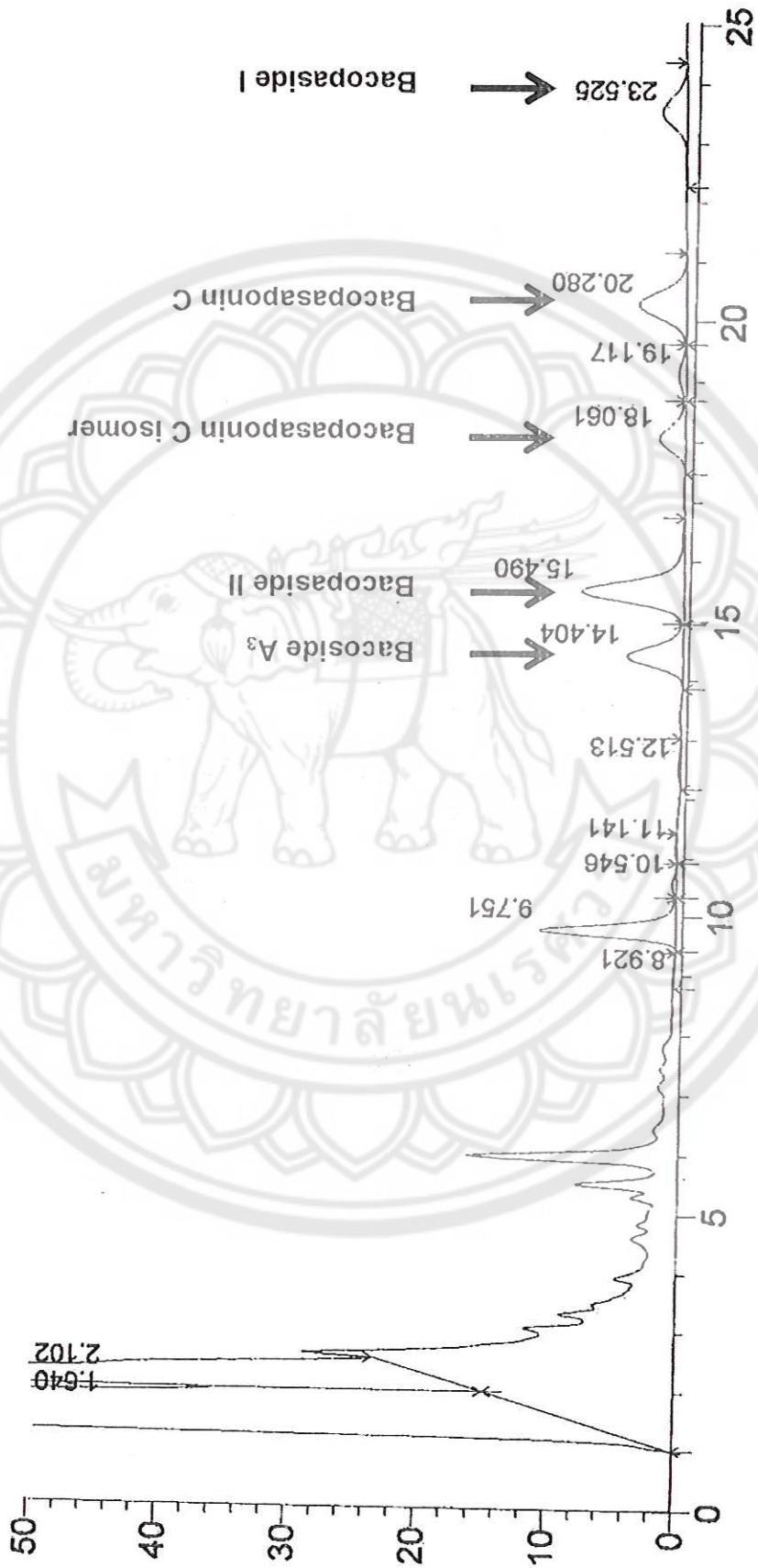
Fig. 2. Effect of *Bacopa monniera* extract (BME) (20, 40, 60 mg/kg) on tracing of blood pressure (A), systolic and diastolic blood pressure (B), and heart rate (C). Data are expressed as mean \pm SEM (n=4-6).
** $p < 0.01$

Fig. 3. Concentration-dependent effect of *Bacopa monniera* extract (BME) (20, 40, 60 mg/kg) in 10^{-6} M PE (A) precontracted denuded rat tail artery rings. Data are expressed as mean \pm SEM (n=7).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig. 4. Effect of *Bacopa monniera* extract (BME) (10, 100 μ g/ml), 10 μ g/ml high saponin, and 10 μ g/ml Bacopaside I on tracing of L-type Ca^{2+} currents ($I_{\text{Ca(L)}}$) on vascular smooth muscle cells (A), decrease of inward $I_{\text{Ca(L)}}$ currents (B). Data are expressed as mean \pm SEM (n= 3-5)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



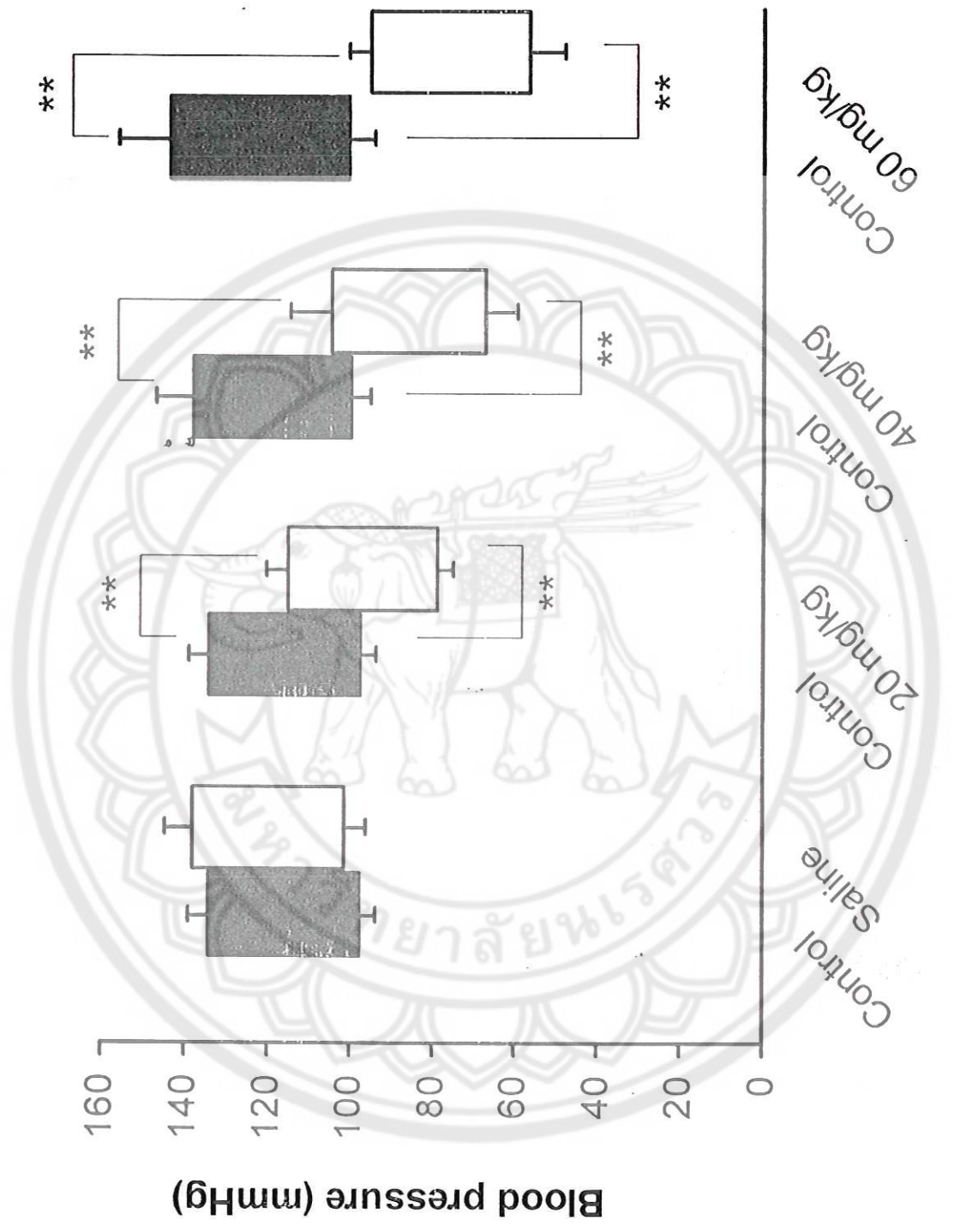
(1)



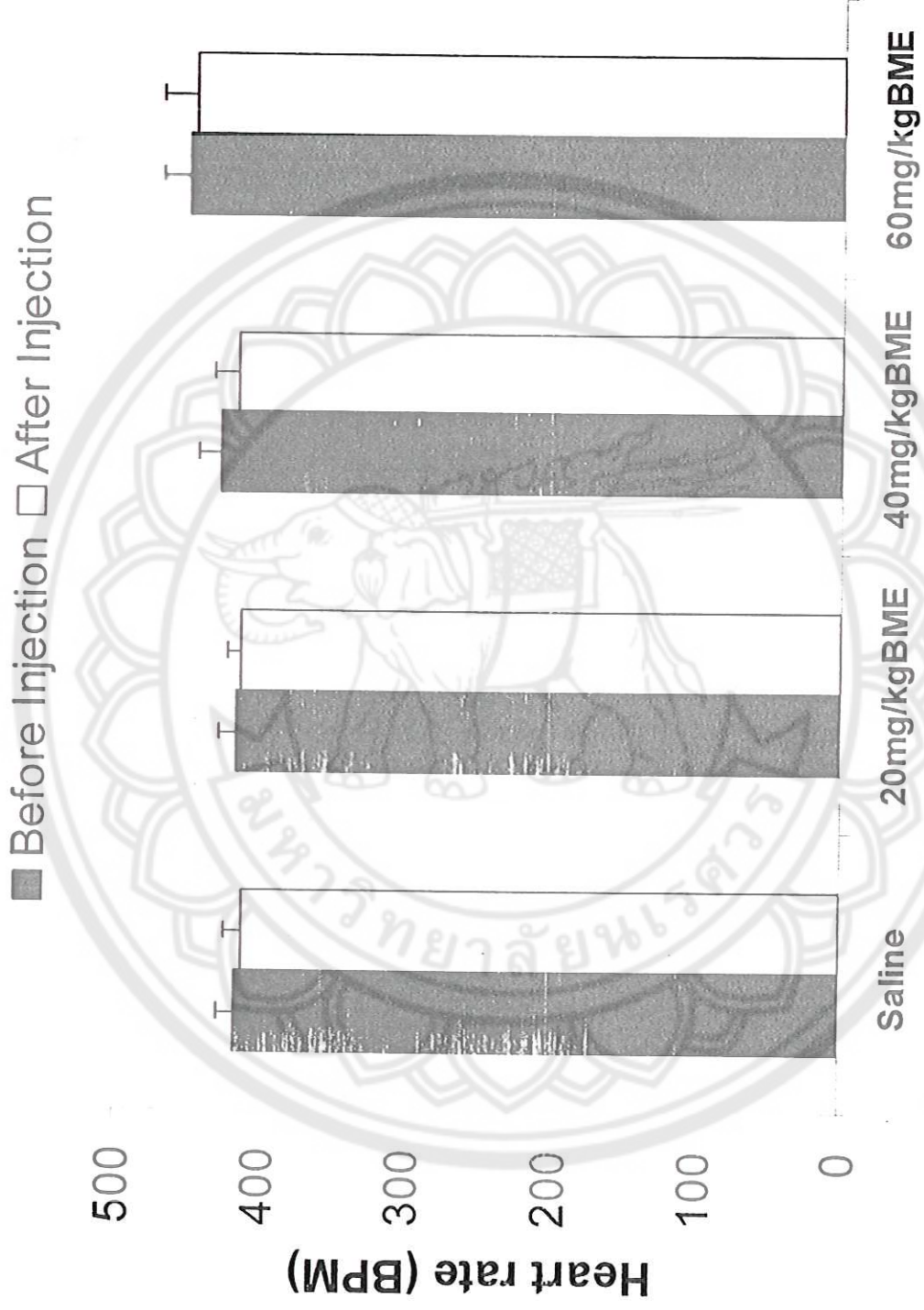
(2A)

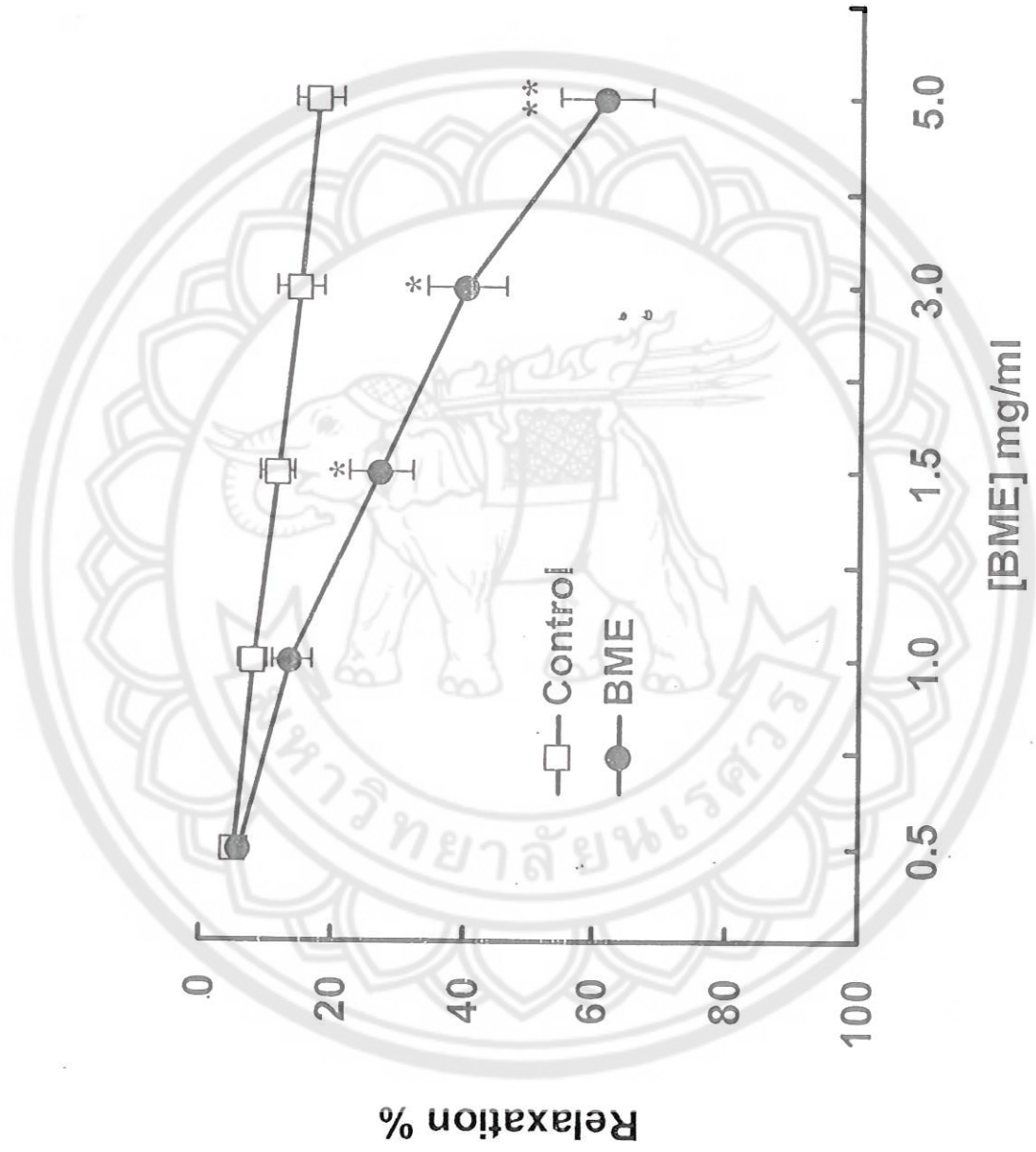


(2B)

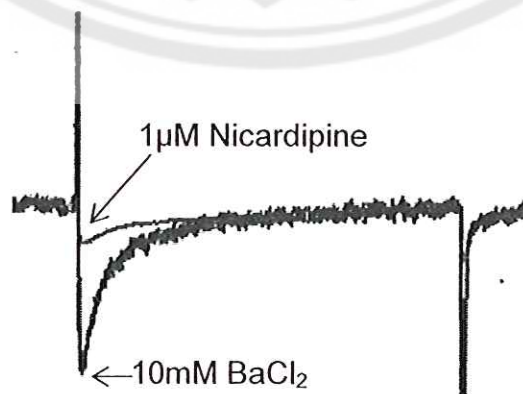
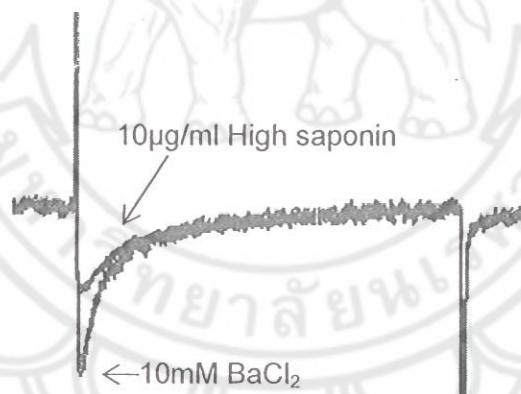
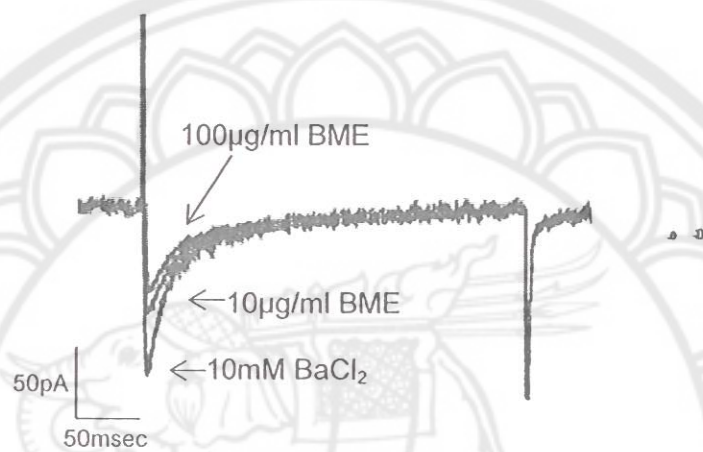


(2C)

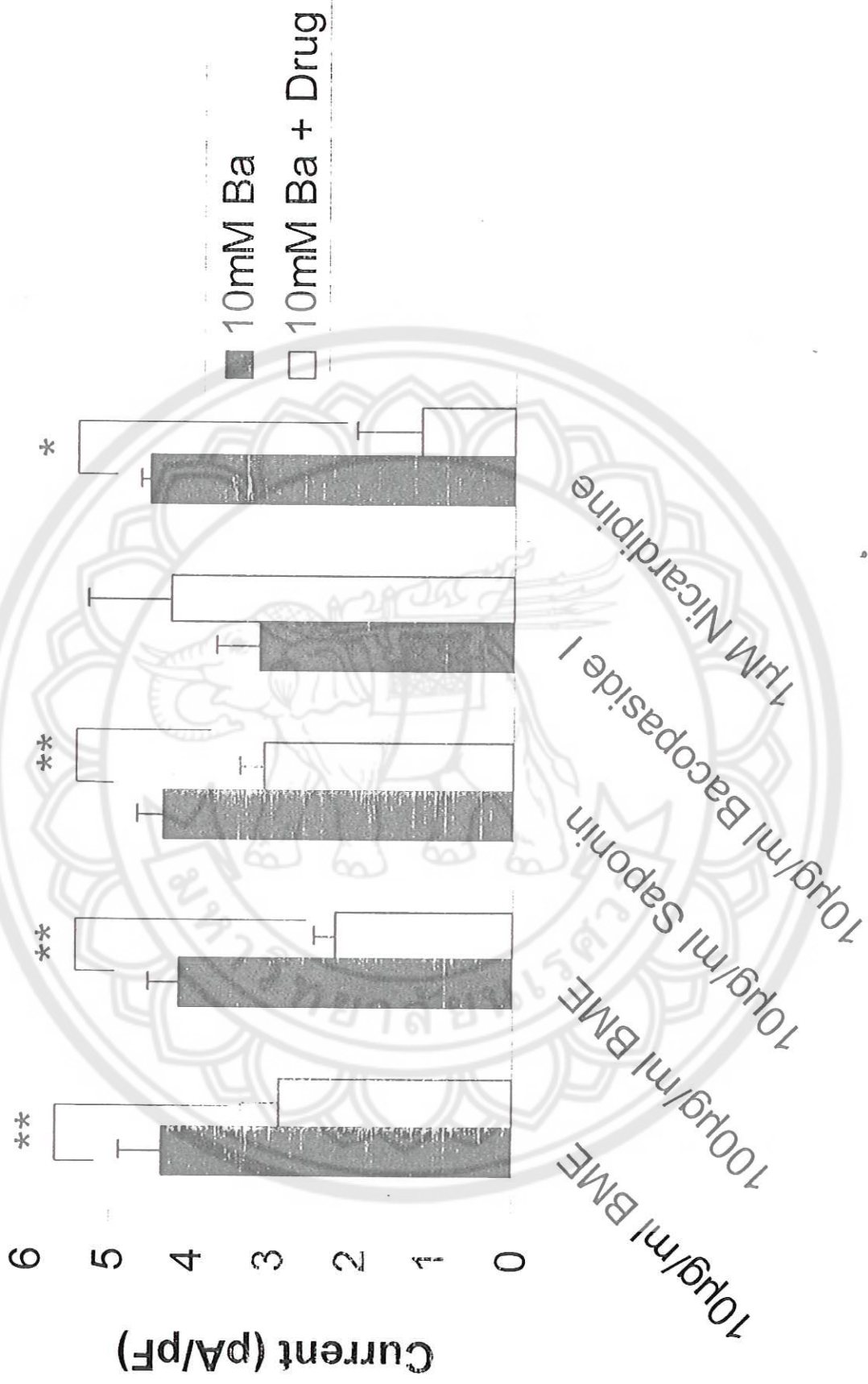




(4A)



(4B)



(4B)

